

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RONAN MACIEL MARCOS

BIOLOGIA REPRODUTIVA DAS ESPÉCIES *Rhamdia branneri* HASEMAN, 1911 E
R. voulezi HASEMAN, 1911, (SILURIFORMES: HEPTAPTERIDAE) EM
CONDIÇÕES DE CATIVEIRO.

CURITIBA

2017

RONAN MACIEL MARCOS

BIOLOGIA REPRODUTIVA DAS ESPÉCIES *Rhamdia branneri* HASEMAN, 1911 E
R. voulezi HASEMAN, 1911, (SILURIFORMES: HEPTAPTERIDAE) EM
CONDIÇÕES DE CATIVEIRO.

Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Doutor em Ciências na
área de Zoologia, no Curso de Pós-Graduação
em Zoologia, Setor Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Fabio Meurer

Coorientador: Prof. Dr. Robie Allan Bombardelli

CURITIBA

2017

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Marcos, Ronan Maciel

Biologia reprodutiva das espécies *Rhamdia branneri* Haseman, 1911 e *R. voulezi* Haseman, 1911, (Siluriformes: Heptapteridae) em condições de cativeiro./ Ronan Maciel Marcos. – Curitiba, 2017.

65 f. : il. ; 30cm.

Orientador: Fabio Meurer

Coorientador: Robie Allan Bombardelli

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Zoologia.

1. Gônadas. 2. Peixe - Reprodução. 3. Morfologia. I. Título. II. Meurer, Fabio. III. Bombardelli, Robie Allan. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Zoologia.

CDD (20. ed.) 597



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós-Graduação ZOOLOGIA

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ZOOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **RONAN MACIEL MARCOS** intitulada: **BIOLOGIA REPRODUTIVA DAS ESPÉCIES *Rhamdia branneri* HASEMAN, 1911 E *Rhamdia voulezi* HASEMAN, 1911, (SILURIFORMES: HEPTAPTERIDAE) EM CONDIÇÕES DE CATIVEIRO**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação.

Curitiba, 24 de Fevereiro de 2017.



FÁBIO MEURER

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)



JORGE ERICK GARCIA PARRA

Avaliador Externo (UFFS)



LILIAN CAROLINA ROSA DA SILVA

Avaliador Externo (UFPR)



MARCOS WEINGARTNER

Avaliador Externo (UFFS)



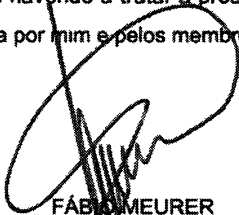
GILMAR BAUMGARTNER

Avaliador Externo (UNIOESTE)

**ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DOUTORADO PARA A OBTENÇÃO DO
GRAU DE DOUTOR EM ZOOLOGIA**

No dia vinte e quatro de Fevereiro de dois mil e dezessete às 14 00 horas, na sala Auditório do Gerpeil, Unioeste, Toledo, foram instalados os trabalhos de arguição do doutorando **RONAN MACIEL MARCOS** para a Defesa Pública de sua tese intitulada **BIOLOGIA REPRODUTIVA DAS ESPÉCIES *Rhamdia branneri* HASEMAN, 1911 E *Rhamdia voulezi* HASEMAN, 1911, (SILURIFORMES HEPTAPTERIDAE) EM CONDIÇÕES DE CATIVEIRO**. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ZOOLOGIA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros **FÁBIO MEURER (UFPR)**, **JORGE ERICK GARCIA PARRA (UFFS)**, **LILIAN CAROLINA ROSA DA SILVA (UFPR)**, **MARCOS WEINGARTNER (UFFS)**, **GILMAR BAUMGARTNER (UNIOESTE)**. Dando início à sessão, a presidência passou a palavra ao discente, para que o mesmo expusesse seu trabalho aos presentes. Em seguida, a presidência passou a palavra a cada um dos Examinadores, para suas respectivas arguições. O aluno respondeu a cada um dos arguidores. A presidência retomou a palavra para suas considerações finais e, depois, solicitou que os presentes e o doutorando deixassem a sala. A Banca Examinadora, então, reuniu-se sigilosamente e, após a discussão de suas avaliações, decidiu-se pela aprovação do aluno. O doutorando foi convidado a ingressar novamente na sala, bem como os demais assistentes após o que a presidência fez a leitura do Parecer da Banca Examinadora. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, **FÁBIO MEURER**, lavrei a presente ata que vai assinada por mim e pelos membros da Comissão Examinadora.

Cunitiba, 24 de Fevereiro de 2017



FÁBIO MEURER

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)



JORGE ERICK GARCIA PARRA

Avaliador Externo (UFFS)



LILIAN CAROLINA ROSA DA SILVA

Avaliador Externo (UFPR)



MARCOS WEINGARTNER

Avaliador Externo (UFFS)



GILMAR BAUMGARTNER

Avaliador Externo (UNIOESTE)

À minha família.

AGRADECIMENTOS

À Marisa, pela dedicação e compreensão neste período.

À minha família pelo apoio incondicional.

Ao orientador e amigo Fabio pela grande parceria e confiança.

Ao coorientador Robie pelo apoio na execução do experimento.

Aos amigos Lucélia, Marcos, Thiago e Giovano pela ajuda e apoio na realização das coletas e manutenção do experimento.

Às colegas Sílvia e Luiza pelo apoio na realização das análises laboratoriais.

Aos colegas dos laboratórios LANOAg e LATRACC pela parceria durante este período.

Aos amigos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo apoio em todos os momentos.

Ao pessoal da coordenação da Pós -Graduação em Zoologia da UFPR pelo excelente trabalho prestado.

Finalmente agradeço a todos que passaram em minha vida e contribuíram para que essa realização fosse concretizada.

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho foi apoiado pela Engie Energia S.A. por meio do Programa de Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) da Agência Nacional de Energia Elétrica (ANEEL), projeto sob protocolo nº PD-0403-0026/2011, intitulado “*Tecnologia para formação de bancos de germoplasma e produção de peixes nativos para estocagem (repovoamento) no Rio Iguaçu*”. E pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES através de bolsa de estudos do Programa Demanda Social – DS.

RESUMO

Rhamdia branneri e *R. voulezi* são duas espécies de Siluriformes endêmicas da bacia do Rio Iguaçu, localizado no Estado do Paraná, Brasil. Os objetivos deste trabalho foram a observação dos eventos morfológicos ao longo do processo de maturação gonadal e do perfil plasmático de esteroides relacionados ao desenvolvimento reprodutivo das espécies *R. branneri* e *R. voulezi* em condições de cativeiro. Animais selvagens foram coletados no Rio Iguaçu e transferidos para o Instituto de Pesquisas em Aquicultura Ambiental – InPAA da Unioeste em Toledo/PR. A partir deste plantel foi realizado o procedimento de reprodução artificial para obtenção das formas jovens. Aproximadamente 500 animais de cada espécie foram estocados e, a partir deste grupo, foram coletados três animais de cada sexo de ambas as espécies ao longo de 13 meses para observação dos eventos reprodutivos em condição de cativeiro. Para tanto, foram coletados dados biométricos e amostras de sangue, logo após, os mesmos foram eutanasiados para coleta e fixação das gônadas. Estas foram processadas para realização de cortes histológicos para observação dos eventos reprodutivos. As amostras de sangue foram processadas e o perfil plasmático de esteroides foi traçado com a utilização de ensaio de imunoabsorção. Para machos das duas espécies foram registradas todas as fases do ciclo reprodutivo. A flutuação dos esteroides sexuais acompanhou o processo de maturação gonadal e variação da relação gonadosomática nas condições do experimento. Não foram registradas fêmeas nas fases de regressão e regeneração, porém em ambas as espécies as fêmeas atingiram a fase de aptas a desovar, como nos machos os esteroides sexuais variaram de forma condizente com os eventos de desenvolvimento gonadal observados. Considerando o padrão do desenvolvimento gonadal, as modificações celulares e alteração dos níveis de esteroides sexuais ao longo do experimento o período reprodutivo das espécies estudadas em condição *ex-situ* ocorreu nos meses de primavera e verão.

Palavras-chave: esteroides sexuais, desenvolvimento gonadal, morfologia de gônadas.

ABSTRACT

Rhamdia branneri and *R. voulezi* are two endemic species of Siluriformes from Iguaçu River Basin, located in the state of Paraná, Brazil. The objectives of this work were the observation of the morphological events during the gonadal maturation process and the plasma steroid profile related to the reproductive development of *R. branneri* and *R. voulezi* species in captive conditions. Wild animals were collected in the Iguaçu River and transferred to Instituto de Pesquisas em Aquicultura Ambiental (Environmental Aquaculture Research Institute) –InPAA of Unioeste in Toledo/PR. The procedure of artificial reproduction for young forms was performed from this campus. About 500 animals of each species were stocked and from this group three animals of each sex of both species were collected during 13 months to observe the reproductive events in captivity. For this purpose, biometric data and blood samples were collected, after they were euthanized for collection and fixation of gonads. These were processed for histological sections to observe the reproductive events. Blood samples were processed and the plasma steroid profile was traced using an immunoabsorption assay. For males of both species, all phases of the reproductive cycle were recorded. The fluctuation of the sexual steroids followed the process of gonadal maturation and variation of the gonadosomatic relationship in the conditions of the experiment. No females were registered in the regression and regeneration phases, but in both species females reached the stage of being able to spawn, as in males the sexual steroids varied according to the gonadal developmental events observed. Considering the pattern of gonadal development, cellular changes and alteration of sexual steroid levels throughout the experiment, the reproductive period of the species studied in ex-situ condition occurred in the spring and in summer months.

Key words: Sexual steroids, gonadal development, morphology of gonads.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – EXEMPLARES DE <i>Rhamdia branneri</i> (A) E <i>R. voulezi</i> (B).....	15
FIGURA 2 – VARIAÇÃO DA TEMPERATURA MÉDIA NA CIDADE DE TOLEDO/PR NO PERÍODO DE REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO.	18
FIGURA 3 – PAPILA UROGENITAL – ASPECTO MACROSCÓPICO DE <i>Rhamdia voulezi</i> : A – FÊMEA E B – MACHO E DE <i>R. branneri</i> : C – FÊMEA. D – MACHO....	21
FIGURA 4 – TESTÍCULOS E OVÁRIOS – ASPECTO MACROSCÓPICO DE <i>Rhamdia voulezi</i> E <i>R. branneri</i> . A – MACHO. B – FÊMEA.....	22
FIGURA 5– LÂMINAS HISTOLÓGICAS DO TESTÍCULO DE <i>Rhamdia voulezi</i>	24
FIGURA 6– LÂMINAS HISTOLÓGICAS DO TESTÍCULO DE <i>Rhamdia branneri</i>	25
FIGURA 6 – VARIAÇÃO DA RELAÇÃO GONADOSSOMÁTICA DE MACHOS DE <i>Rhamdia voulezi</i> NO PERÍODO ENTRE JUNHO DE 2015 E JUNHO DE 2016.	27
FIGURA 7 – DISTRIBUIÇÃO DAS FASES DE DESENVOLVIMENTO GONADAL DE MACHOS DE <i>Rhamdia voulezi</i> ENTRE OS MESES DE JUNHO DE 2015 A JUNHO DE 2016.	27
FIGURA 8 – VARIAÇÃO DOS NÍVEIS DE TESTOSTERONA PLASMÁTICA DE MACHOS DE <i>Rhamdia voulezi</i> ENTRE OS MESES DE JUNHO DE 2015 A JUNHO DE 2016.	28
FIGURA 9 – VARIAÇÃO DOS NÍVEIS DE 17-BETA-ESTRADIOL PLASMÁTICO DE MACHOS DE <i>Rhamdia voulezi</i> ENTRE OS MESES DE JUNHO DE 2015 A JUNHO DE 2016.	28
FIGURA 10 – VARIAÇÃO DA RELAÇÃO GONADOSSOMÁTICA DE MACHOS DE <i>Rhamdia branneri</i> NO PERÍODO ENTRE JUNHO DE 2015 E JUNHO DE 2016.	30
FIGURA 11 – DISTRIBUIÇÃO DAS FASES DE DESENVOLVIMENTO GONADAL DE MACHOS DE <i>Rhamdia branneri</i> ENTRE OS MESES DE JUNHO DE 2015 A JUNHO DE 2016.	30
FIGURA 12 – VARIAÇÃO DOS NÍVEIS DE TESTOSTERONA PLASMÁTICA DE MACHOS DE <i>Rhamdia branneri</i> ENTRE OS MESES DE JUNHO DE 2015 A JUNHO DE 2016.	31
FIGURA 13 – VARIAÇÃO DOS NÍVEIS DE 17-BETA-ESTRADIOL PLASMÁTICO DE MACHOS DE <i>Rhamdia branneri</i> ENTRE OS MESES DE JUNHO DE 2015 A JUNHO DE 2016.	32

FIGURA 14 – LÂMINAS HISTOLÓGICAS DE OVÁRIOS DE FÊMEAS DE <i>Rhamdia voulezi</i> E <i>R. branneri</i> .	33
FIGURA 15 – VARIAÇÃO DA RELAÇÃO GONADOSSOMÁTICA DE FÊMEAS DE <i>Rhamdia voulezi</i> NO PERÍODO ENTRE JUNHO DE 2015 E JUNHO DE 2016.	35
FIGURA 16 – DISTRIBUIÇÃO DAS FASES DE DESENVOLVIMENTO GONADAL DE FÊMEAS DE <i>Rhamdia voulezi</i> ENTRE OS MESES DE JUNHO DE 2015 A JUNHO DE 2016.	35
FIGURA 17 – VARIAÇÃO DOS NÍVEIS DE TESTOSTERONA PLASMÁTICA DE FÊMEAS DE <i>Rhamdia voulezi</i> ENTRE OS MESES DE JUNHO DE 2015 A JUNHO DE 2016.	36
FIGURA 18 – VARIAÇÃO DOS NÍVEIS DE 17-BETA-ESTRADIOL PLASMÁTICO DE FÊMEAS DE <i>Rhamdia voulezi</i> ENTRE OS MESES DE JUNHO DE 2015 A JUNHO DE 2016.	36
FIGURA 19 – VARIAÇÃO DA RELAÇÃO GONADOSSOMÁTICA DE FÊMEAS DE <i>Rhamdia voulezi</i> NO PERÍODO ENTRE JUNHO DE 2015 E JUNHO DE 2016.	38
FIGURA 20 – DISTRIBUIÇÃO DAS FASES DE DESENVOLVIMENTO GONADAL DE FÊMEAS DE <i>Rhamdia branneri</i> ENTRE OS MESES DE JUNHO DE 2015 A JUNHO DE 2016.	39
FIGURA 21 – VARIAÇÃO DOS NÍVEIS DE TESTOSTERONA PLASMÁTICA DE FÊMEAS DE <i>Rhamdia branneri</i> ENTRE OS MESES DE JUNHO DE 2015 A JUNHO DE 2016.	39
FIGURA 22 – VARIAÇÃO DOS NÍVEIS DE 17-BETA-ESTRADIOL PLASMÁTICO DE FÊMEAS DE <i>Rhamdia branneri</i> ENTRE OS MESES DE JUNHO DE 2015 A JUNHO DE 2016.	40
FIGURA 23 – OVÁRIO DE <i>Rhamdia voulezi</i> COM CRESCIMENTO IRREGULAR, GÔNADA NA POSIÇÃO SUPERIOR DA IMAGEM ATROFIADA.	41

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – DADOS BIOMÉTRICOS DOS MACHOS DE <i>Rhamdia voulezi</i> , COLETADOS ENTRE JUNHO DE 2015 E JUNHO DE 2016.	26
TABELA 2 - DADOS BIOMÉTRICOS DOS MACHOS DE <i>Rhamdia branneri</i> , COLETADOS ENTRE JUNHO DE 2015 E JUNHO DE 2016.	29
TABELA 3 - DADOS BIOMÉTRICOS DAS FÊMEAS DE <i>Rhamdia voulezi</i> , COLETADAS ENTRE JUNHO DE 2015 E JUNHO DE 2016.....	34
TABELA 4 – DADOS BIOMÉTRICOS DAS FÊMEAS DE <i>Rhamdia branneri</i> , COLETADOS ENTRE JUNHO DE 2015 E MAIO DE 2016.....	37

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 CARACTERIZAÇÃO GERAL DOS SILURIFORMES	12
1.2 BIOTÉCNICAS APLICADAS A REPRODUÇÃO EM CATIVEIRO	13
1.3 REPRODUÇÃO EM CATIVEIRO.....	13
1.4 <i>Rhamdia branneri</i> E <i>Rhamdia voulezi</i>	14
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 OBJETIVOS GERAIS	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 AMOSTRAGEM.....	17
3.2 ANÁLISE DE ESTERÓIDES.....	18
3.3 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA	19
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	20
4 RESULTADOS.....	21
4.1 DIMORFISMO SEXUAL	21
4.2 MACHOS	23
4.2.1 CICLO REPRODUTIVO	23
4.2.2 <i>Rhamdia voulezi</i>	25
4.2.3 <i>Rhamdia branneri</i>	29
4.3 FÊMEAS	32
4.3.1 CICLO REPRODUTIVO	32
4.3.2 <i>Rhamdia voulezi</i>	34
4.3.3 <i>Rhamdia branneri</i>	37
4.3 ANORMALIDADES.....	40
5 DISCUSSÃO	42
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
ANEXOS	60

1 INTRODUÇÃO

1.1 CARACTERIZAÇÃO GERAL DOS SILURIFORMES

Os Siluriformes são um grupo monofilético e apresentam distribuição global, em ambientes estuarinos, de água doce e marinha (HARDMAN, 2005). São um clado muito diversificado com mais de três mil espécies válidas vivas, além de um número estimado em 1750 espécies ainda sem uma descrição ao redor do mundo. O número de espécies tende a crescer ainda mais, pois no início da década de 2000, foram descritas 332 novas espécies de Siluriformes, sendo incluídas em nove novos gêneros e uma família (SULLIVAN; LUNDBERG e HARDMAN, 2006).

Habitualmente chamados de peixe-gato ou bagre, os Siluriformes são peixes de corpo nu ou coberto por placas ósseas e geralmente apresentam barbilhões na cabeça. Algumas espécies podem ser venenosas e possuir acículas nas nadadeiras. Em diversos locais ao redor do mundo são valorizados na pesca desportiva e como item alimentar importante. Podem atingir grandes tamanho, um exemplo é o siluru *Silurus glanis* Linnaeus, 1758, com tamanho de até três metros de comprimento (NELSON, 2006).

Considerando a sua distribuição mundial, principalmente por colonizar diversos ambientes de água doce, os Siluriformes despertam grande interesse para ecologistas e evolucionistas, além de possuírem importância em estudos biogeográficos (LUNDBERG, et al., 2000).

No Brasil, a ordem dos Siluriformes ocupa a segunda posição em número de espécies, ficando atrás dos Characiformes (ROSA e LIMA, 2008). São bastante importantes economicamente e tem registros expressivos na produção de pescado marinho e continental, independente da sua origem, extrativa ou da aquicultura. O bagre marinho é a espécie com maior exploração (MPA, 2013).

Na bacia do Rio Iguaçu os Siluriformes possuem vários representantes e tem como característica marcante o endemismo. Além disso diversas espécies não nativas dessa ordem estão sendo introduzidas (BAUMGARTNER, et al., 2012).

1.2 BIOTÉCNICAS APLICADAS A REPRODUÇÃO EM CATIVEIRO

A utilização e manipulação de animais procurando obter o melhor proveito possível é umas das definições de biotecnia (FIGUEIREDO, 2007). As vantagens da utilização das biotécnicas são várias, mas podem ser sumarizadas em: ferramenta importante para compreensão da fisiologia reprodutiva; multiplicação de animais geneticamente superiores; formação de bancos de germoplasma animal; permitir a reposição de espécies ameaçadas de extinção. Porém, o uso indiscriminado de biotécnicas pode levar a transgressão de algumas barreiras éticas e se tornar prejudicial para o desenvolvimento do estado da arte (FIGUEIREDO, 2008).

1.3 REPRODUÇÃO EM CATIVEIRO

As pressões impostas pela ação antrópica sobre as populações de peixes são muitas, barramentos de rios, redução das áreas de mata ciliar e vegetação nativa, poluição, introdução de espécies exóticas, entre outras. Estas ações podem ameaçar ou levar algumas espécies à extinção (POMPEU; AGOSTINHO e PELICICE, 2012; DAGA, et al., 2015; GOIS, et al., 2015; LOBON-CERVIA, et al., 2015). Como exemplo, no Brasil 35 espécies da ordem dos Siluriformes têm o status de espécie ameaçada, incluindo diversas com ocorrência exclusiva, sendo muitas delas endêmicas de um único rio (ROSA e LIMA, 2008).

No sentido de contribuir com a preservação e recuperação de estoques *in situ*, diversas estratégias podem ser adotadas, como a manutenção do habitat natural, controle de nível de água, manipulação de abrigos, manipulação de locais de desova e de criadouros naturais e controle da pesca (AGOSTINHO et al., 2004).

Por outro lado a manutenção de animais selvagens em cativeiro, pode ser considerada uma importante ferramenta para a conservação das espécies (SILVA, SIQUEIRA e MARVULO, 2008). Já a reprodução em cativeiro de peixes tem importância para a indústria, a conservação ambiental e para a pesquisa, tendo em vista que as proles podem ser empregadas em programas de repovoamento e estocagem de animais (GODINHO, 2007). Aliado a isso, o uso racional do sêmen, em conjunto com técnicas de reprodução artificial, reduz a necessidade de progenitores

e aumenta a eficiência dos programas de reprodução voltados à conservação, contribuindo com a gestão sustentável de diversos táxons (BROWNE, et al., 2015).

Além disso, pesquisas com animais em cativeiro podem fornecer informações da biologia básica de uma espécie e sugerir novas estratégias de conservação para populações *in situ*, possibilitando a formulação de novas hipóteses. Populações de cativeiro que são sustentáveis podem também reduzir a necessidade de se retirar indivíduos selvagens do ambiente para exposição ou para fins de pesquisa, o que é muito comum no meio científico. Entretanto, fato importante a ser considerado é o custo para conservá-las em cativeiro, que em diversas situações é alto (PRIMACK e RODRIGUES, 2001).

Nesse sentido a busca pela otimização de todos os aspectos relacionados a prática da reprodução em cativeiro de Siluriformes é importante, sendo consideradas prioritárias as pesquisas relativas à maturidade sexual, indução artificial da desova, fecundidade e preservação de sêmen (GODINHO, 2007).

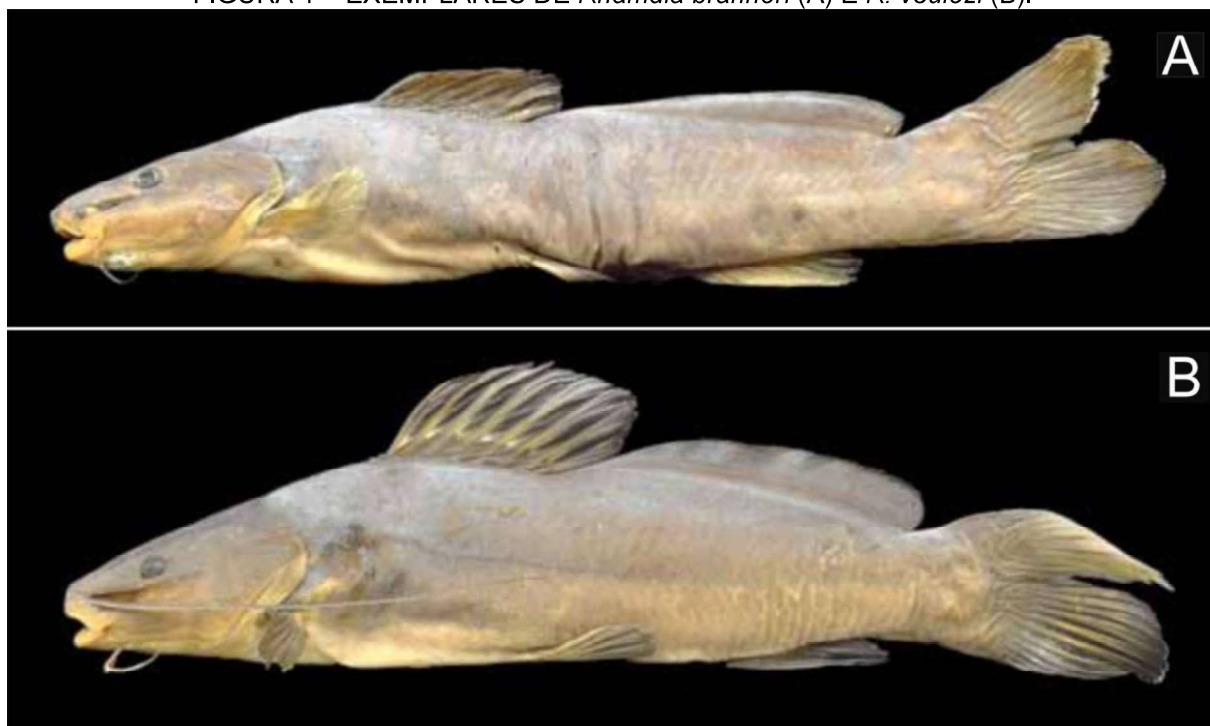
1.4 *Rhamdia branneri* E *Rhamdia voulezi*

O gênero *Rhamdia* é parte integrante da ordem Siluriformes e família Heptapteridea (BAUMGARTNER, et al., 2012; FROESE e PAULY, 2017), estes são caracterizados pelo corpo sem escamas recoberto por pele ou placas ósseas (NAKATANI, et al., 2001). *Rhamdia branneri* Haseman, 1911 e *Rhamdia voulezi* Haseman, 1911 são espécies com distribuição geográfica restrita ao Rio Iguaçu (BAUMGARTNER, et al., 2012). Estas espécies foram consideradas sinônimas de *Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard, 1824, porém evidências de diferenças genéticas e ecomorfológicas deixam em dúvida tal fato (ABUCARMA e MARTINS-SANTOS, 2001; BAUMGARTNER, et al., 2012; MISE, et al., 2013).

Recentemente, baseados em sua morfometria e estudos de cariótipos, os autores Garavello e Shibatta (2016) recomendaram a manutenção dos nomes *R. branneri* e *R. voulezi* para o Rio Iguaçu. Uma das características externas que é utilizada na distinção entre as espécies é o comprimento da nadadeira dorsal, quando a nadadeira dorsal alcança a adiposa quando adpressa, se trata de *R. voulezi*, e quando a nadadeira dorsal não alcança a adiposa quando adpressa, se trata de *R.*

branneri, de acordo com a chave de identificação das espécies do gênero *Rhamdia* para o baixo Rio Iguaçu proposta por Baumgartner, et al., (2012) (FIGURA 1).

FIGURA 1 – EXEMPLARES DE *Rhamdia branneri* (A) E *R. voulezi* (B).



FONTE: BAUMGARTNER, et al., 2012.

As duas espécies tem comportamentos semelhantes, são espécies piscívoras, sua reprodução, em ambiente natural, ocorre de setembro a março para *R. branneri* e de setembro a fevereiro para *R. voulezi* (SUZUKI e AGOSTINHO, 1997), o corpo é de coloração cinza com a região ventral mais clara (BAUMGARTNER, et al., 2012).

Diversas pesquisas estão sendo realizadas com estas espécies, principalmente com *R. voulezi*, concentradas principalmente em aspectos ligados a nutrição (FEIDEN, et al., 2010; PESSINI, et al., 2014; REIS, et al., 2012), manejo (SIGNOR, et al., 2013; DIEMER, et al., 2012) e processamento da carne (SIGNOR, et al., 2015). Aspectos ligados a biologia reprodutiva básica das espécies ainda não são muito explorados.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Os objetivos deste trabalho foram identificar os eventos morfológicos ao longo do processo de maturação gonadal e avaliar o perfil plasmático de esteroides relacionados ao desenvolvimento reprodutivo de *R. branneri* e *R. voulezi* em condições de cativeiro.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Acompanhar o desenvolvimento gonadal de *R. branneri* e *R. voulezi*;
- Determinar o período de maturação de machos e fêmeas das espécies *R. branneri* e *R. voulezi* em condição *ex-situ*;
- Avaliar os estádios de maturação oocitária e o desenvolvimento testicular ao longo do período reprodutivo;
- Acompanhar a dinâmica de proliferação celular ao longo do ciclo reprodutivo de machos e fêmeas;
- Observar a flutuação de esteroides plasmáticos durante o desenvolvimento das gônadas das espécies em estudo;
- Observar diferenças nos parâmetros aferidos entre as duas espécies.

3 MATERIAL E MÉTODOS

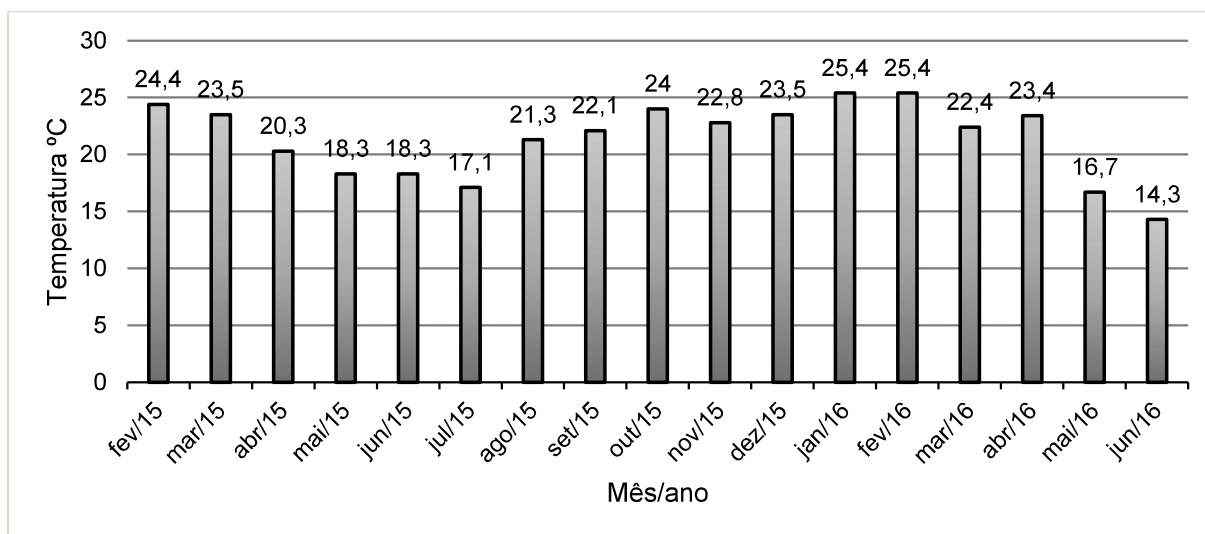
3.1 AMOSTRAGEM

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Tecnologia da Reprodução de Animais Aquáticos - LATRAAC, na Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *Campus* Toledo – PR e no Laboratório de Bioquímica e Genética da Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus* Laranjeiras do Sul - PR.

Os peixes utilizados foram provenientes do LATRAAC, oriundos de reprodução controlada em cativeiro, realizada em fevereiro de 2015, com reprodutores selvagens de *R. branneri* e *R. voulezi* coletados no baixo Rio Iguaçu-PR, nos anos de 2012 a 2014, e de primeira geração (F1) oriundos de processo de reprodução controlada realizada no mesmo laboratório. Machos e fêmeas receberam indução hormonal através da aplicação de extrato bruto de hipófise de carpa ($3,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ de reprodutor para machos em uma única dose e $0,5$ e $5,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ de reprodutor para fêmeas em duas doses com intervalo de 12 horas). Após 240 unidades térmicas acumuladas, os gametas foram coletados a seco, misturados e hidratados. Os ovos foram incubados e mantidos em incubadoras cônicas. Sete dias após, as larvas foram transferidas para viveiros de terra, calados, adubados e foram alimentadas com ração comercial para juvenis.

Em março de 2015 foram estocados aproximadamente 500 animais de cada espécie em tanques escavados, com laterais revestidas de concreto e fundo em terra, com área de 200m^2 , dotados de sistema de controle de escape, sob condições de temperatura (FIGURA 2) e fotoperíodo natural. Os viveiros foram abastecidos com água de represa localizada no Rio São Francisco Falso com o objetivo de apenas repor as perdas por infiltração e evaporação. Os peixes foram alimentados com ração comercial contendo 32% de proteína bruta duas vezes ao dia, com taxa de aproximadamente 1% do peso vivo.

FIGURA 2 – VARIAÇÃO DA TEMPERATURA MÉDIA NA CIDADE DE TOLEDO/PR NO PERÍODO DE REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO.



FONTE: Adaptado de Sistema Meteorológico do Paraná (SIMEPAR, 2016).

A partir dos três meses de vida, foram realizadas capturas mensais (30/05/2015 jun/2015; 03/07/2015 – jul/2015; 01/08/2015 – ago/2015; 07/09/2015 – set/2015; 05/10/2015 – out/2015; 03/11/2015 – nov/2015; 05/12/2015 – dez/2015; 06/01/2016 – jan/2016; 01/02/2016 – fev/2016; 04/03/2016 – mar/2016; 28/03/2016 – abril/2016; 02/05/2016 – maio/2016; 07/06/2016 – jun/2016), utilizando redes de arrasto, nas quais eram coletados aleatoriamente três machos e três fêmeas de cada espécie estudada.

Após amostrados os animais foram submetidos à anestesia por imersão em solução de benzocaína, na concentração de 200mg.l⁻¹ de água, (CFMV, 2012) para realização de biometria e obtenção dos dados de peso, comprimento padrão e comprimento total.

3.2 ANÁLISE DE ESTEROIDES

Após a realização da amostragem e biometria, amostras de sangue de dois machos e duas fêmeas de cada espécie foram coletadas com a utilização de seringas heparinizadas e centrifugadas (4000 rotações por minuto durante 20 minutos) para

separação do plasma sanguíneo. Estas amostras de plasma sanguíneo foram congeladas para posterior avaliação dos níveis dos esteroides (TESSARO, 2015).

A determinação dos níveis de estradiol (17-beta-estradiol) e testosterona foi realizada com a utilização do método de imunoensaio enzimático (ELISA), com o uso de kits comerciais (IBL International ©, 17-beta-estradiol – RE52041 e testosterona – RE52151) e leitora de microplacas Multiskan GO marca Thermo ©, no Laboratório de Bioquímica e Genética da Universidade Federal da Fronteira Sul – *Campus Laranjeiras do Sul/PR*.

3.3 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Após a coleta de sangue, os animais foram eutanasiados por meio de overdose de benzocaína (CFMV, 2012) e dissecados para retirada das gônadas. Estas foram pesadas em balança digital, para a obtenção da relação gonadossomática (Δ RGS), com vistas a contribuir na determinação do período reprodutivo (VAZZOLER, 1996).

Para avaliação histológica as gônadas após pesadas foram fixadas em solução de Bouin por 24 horas, após esse período foram mantidas em álcool 70% até seu processamento (Adaptado BEÇAK e PAULETE, 1976).

A desidratação em álcool etílico e inclusão das gônadas em parafina foi feita conforme o protocolo adaptado de Beçak e Paulete (1976). Após a formação dos blocos os mesmos foram cortados na espessura de 5 μ m com a utilização de micrótomo histológico manual. Após o corte algumas amostras foram selecionadas e acomodadas em lâminas de vidro para a coloração do material cortado. Para coloração do material foi utilizado o método hematoxilina-eosina. Após a coloração as lâminas foram montadas com a utilização de bálsamo do Canadá e uma lamínula.

Os cortes histológicos foram analisados em microscópio óptico, em objetivas de 4 e 10x, e classificados conforme o grau de maturação gonadal de acordo com a metodologia de Brown-Petersen, Grier e Overstreet (2011), sendo eles: imaturo, desenvolvimento, apto a espermiar, regressão e regeneração para machos e imatura, desenvolvimento, apta a desovar, regressão e regeneração para fêmeas.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Parâmetros biométricos (comprimento padrão, peso, peso das gônadas, relação gonadossomática e níveis hormonais) foram submetidos a análise de variância, verificado o efeito do tratamento foram submetidos ao teste de médias de Tukey.

Além disso a variação da relação gonadossomática, dos níveis hormonais e a distribuição da frequência das fases de maturação gonadal foram convertidos em gráficos para evidenciar sua variação ao longo do experimento.

Foi estabelecido para todas as análises um nível de 5 % de significância. Todas as rotinas foram executadas nos softwares Statistica 7.0 (STATSOFT, 2004). e Excel 2016 (MICROSOFT, 2016).

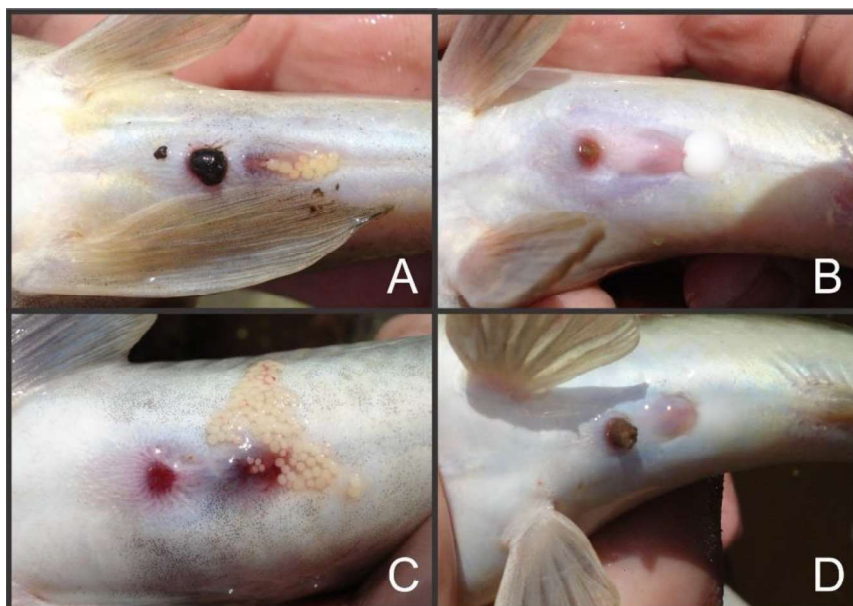
4 RESULTADOS

Os animais de ambas as espécies apresentaram bom aspecto geral, com exceção do período entre os meses de junho e agosto de 2015 quando alguns animais apresentaram ictioftíriase. Além disso, não foram notados indícios de canibalismo ou ferimentos causados por competição durante o período em que os animais foram observados.

4.1 DIMORFISMO SEXUAL

O dimorfismo sexual, em ambas as espécies, pode ser notado a partir do sexto mês após a eclosão das larvas. Externamente, tal fato é caracterizado principalmente pela diferenciação da papila urogenital, as fêmeas têm a papila mais arredondada enquanto nos machos, geralmente, é mais alongada (FIGURA 3). Além disso a partir do mês de agosto de 2015 alguns machos de ambas espécies apresentaram liberação de sêmen após serem submetidos a leve pressão na região abdominal, o volume não foi mensurado.

FIGURA 3 – PAPILA UROGENITAL – ASPECTO MACROSCÓPICO DE *Rhamdia voulezi*: A – FÊMEA E B – MACHO E DE *R. branneri*: C – FÊMEA. D – MACHO.



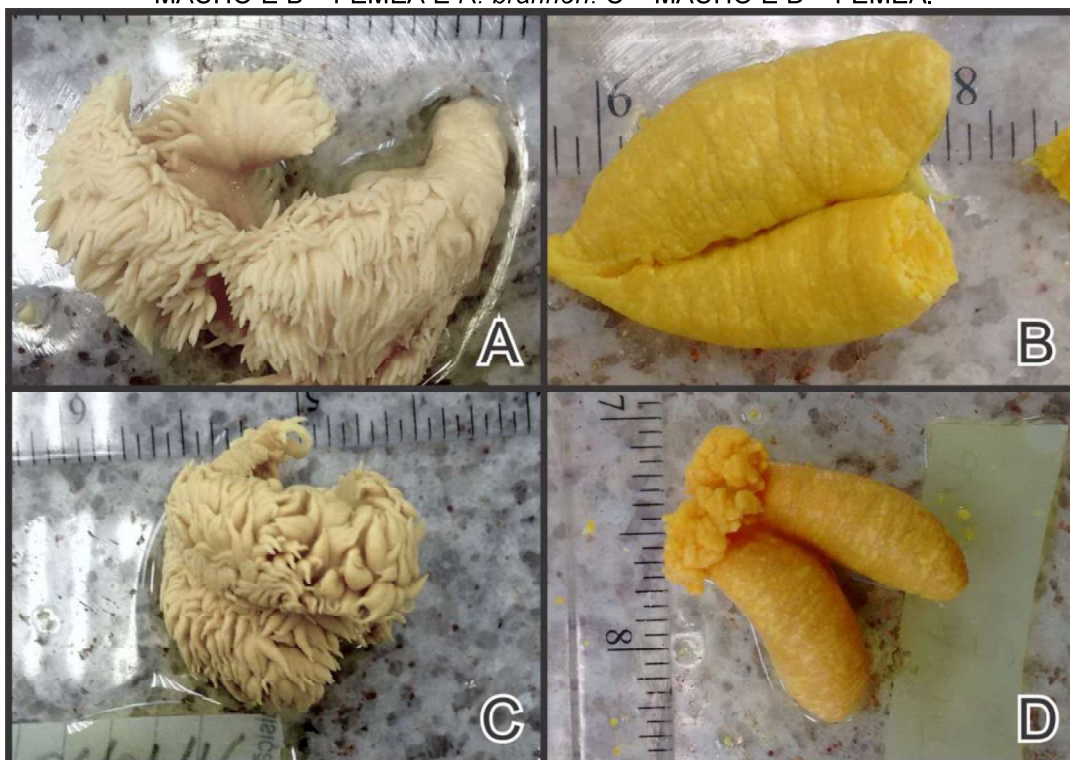
FONTE: O autor (2015).

Além das características externas de dimorfismo sexual a partir do mês de setembro, foi possível a diferenciação macroscópica dos ovários e testículos dos animais dissecados (FIGURA 4).

Machos apresentam testículos em pares que se alongam no sentido antero-posterior. Apresentam uma fusão na sua porção final formando o duto espermático, que termina na papila urogenital, esses ficam localizados no fundo da cavidade abdominal próximos da coluna vertebral. Foi observado um aumento dos testículos de ambas as espécies a partir do oitavo mês de idade. Estes se tornaram maiores e mais túrgidos, a coloração se tornou esbranquiçada e a presença de projeções digitiformes (franjas) ao longo de todo o testículo, no sentido ventral, se tornou mais evidente (FIGURA 4 A).

Os ovários também ocorrem em pares e possuem características de tamanho e posição de localização semelhante a dos testículos. O que os diferencia é que ao longo do tempo se tornaram mais amarelados, com um aspecto granuloso e com maior irrigação sanguínea e não desenvolveram as franjas (FIGURA 4 B). Também a partir do oitavo mês de vida foi possível identificar a presença de ovócitos a olho nu em alguns ovários.

FIGURA 4 – TESTÍCULOS E OVÁRIOS – ASPECTO MACROSCÓPICO DE *Rhamdia voulezi*: A – MACHO E B – FÊMEA E *R. branneri*: C – MACHO E D – FÊMEA.



FONTE: O autor (2017).

4.2 MACHOS

4.2.1 CICLO REPRODUTIVO

Nas duas espécies foram observadas todas as fases do ciclo reprodutivo. Porém as fases: imaturo, desenvolvimento e apto a espermiar foram as mais frequentes.

Em animais imaturos foram identificadas, predominantemente a presença de espermatogônias, sem diferenciação em outras estruturas, como espermatócitos, espermatídes e espermatozoides (FIGURA 5 A e FIGURA 6 A), o testículo apresentou um aspecto delgado e translúcido e sem a presença das franjas. Em diversas ocasiões, devido ao pequeno tamanho dos animais e dos testículos nesta fase a coleta dos mesmos foi dificultada, exigindo maior perícia para sua realização.

Evoluindo para a fase de desenvolvimento as células germinativas se diferenciaram em todos os tipos de células germinativas (espermatogônias, espermatócitos, espermatídes e espermatozoides) (FIGURA 5 B e FIGURA 6 B). O aspecto macroscópico se alterou apresentando uma cor esbranquiçada e o volume do órgão aumentado, porém sem grande evidência das franjas.

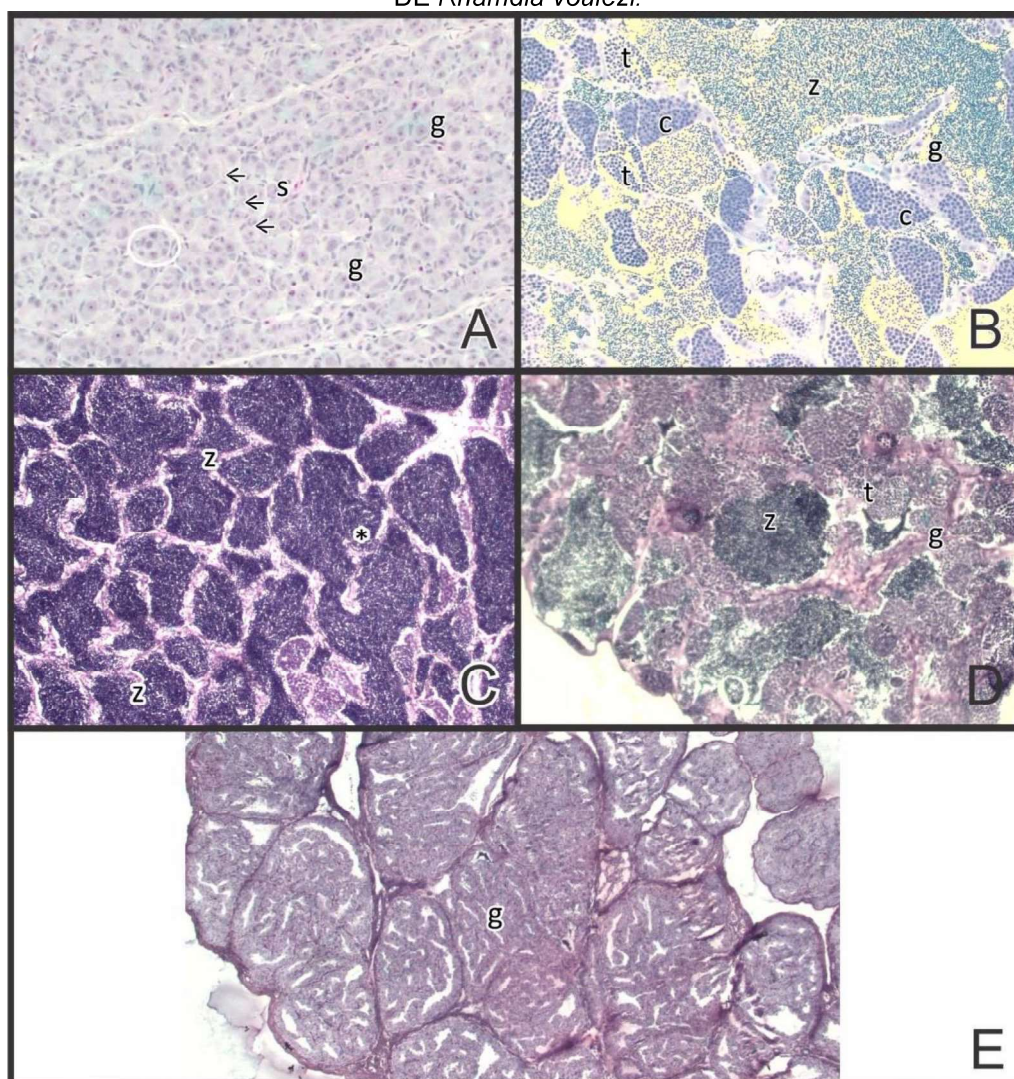
Quando aptos a espermiar o aspecto microscópico das gônadas se altera de forma significativa, sendo visualizadas células em diferenciação, porém foi notado um volume massivo de espermatozoides e o aparecimento de áreas em anastomose (FIGURA 5 C e FIGURA 6 C). Macroscopicamente o testículo se apresenta turgido, com grande volume esbranquiçado e as franjas são evidentes. Nesta fase, quando manipulados, animais de ambas as espécies apresentaram fácil liberação de sêmen, inclusive sem a necessidade de pressão na região abdominal.

Após o período em que os animais estiveram aptos a espermiar foram encontrados animais na fase de regressão, em que os espermatozoides produzidos e não liberados são absorvidos pelo corpo e a gônada começa a se preparar para a fase de regeneração. Neste momento, microscopicamente são observados espermatozoides residuais e repovoamento do testículo por espermatogônias

(FIGURA 5 D e FIGURA 6 D), o aspecto macroscópico deixa de ser esbranquiçado e se torna amarelado com grande irrigação sanguínea e a turgidez diminui.

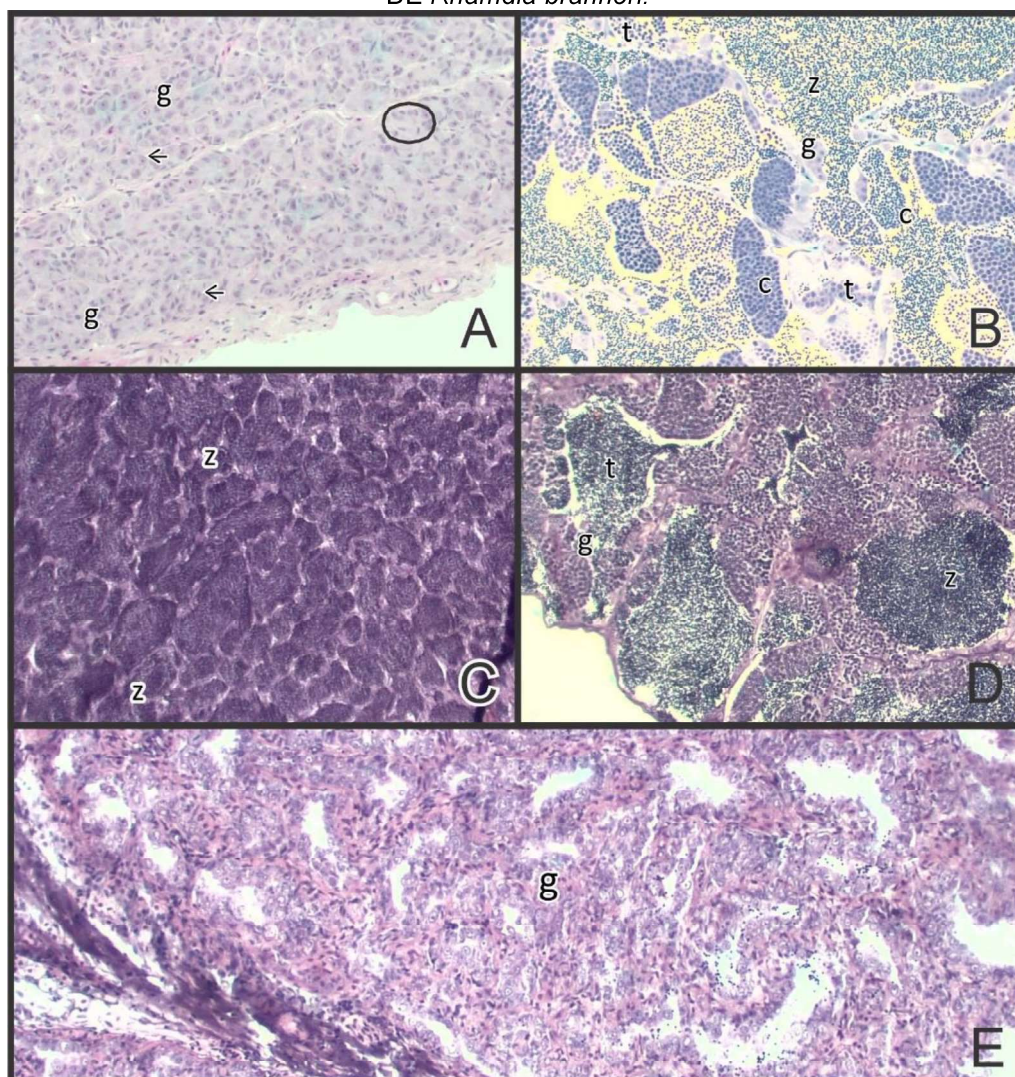
Entrando na fase de regeneração os túbulos do testículo já estão repovoados por espermatogônias (FIGURA 5 E e FIGURA 6 E) e este começa a se preparar para o próximo período reprodutivo, o volume da gônada diminui e a coloração volta a ser esbranquiçada.

FIGURA 5– LÂMINAS HISTOLÓGICAS E ASPECTO MACROSCÓPICO DO TESTÍCULO MADURO DE *Rhamdia voulezi*.



A – Estágio imaturo: abundância de espermatogônias (g) e células de Sertoli (setas). Área circulada indica um ninho de espermatogônias; B – estágio de desenvolvimento, diferenciação em todos os tipos de células germinativas (espermatogônias (g), cistos de espermatócitos (c), espermatídes (t) e espermatozoides (z)); C – apto a espermiar, presença massiva de espermatozoides (z), observação de áreas de anastomose (*); D – estágio de regressão, repovoamento por espermatogônias (g) e presença de espermatozoides residuais (z) e poucos cistos com espermatídes (t); E – estágio de regeneração, abundância de espermatogônias (g) que indicam o repovoamento dos túbulos. FONTE: O autor (2017).

FIGURA 6– LÂMINAS HISTOLÓGICAS E ASPECTO MACROSCÓPICO DO TESTÍCULO MADURO DE *Rhamdia branneri*.



A – Estágio imaturo: abundância de espermatogônias (g) e células de Sertoli (setas). Área circutada indica um ninho de espermatogônias; B – estágio de desenvolvimento, diferenciação em todos os tipos de células germinativas (espermatogônias (g), cistos de espermatócitos (c), espermatídes (t) e espermatozoides (z)); C – apto a espermiar, presença massiva de espermatozoides (z); D – estágio de regressão, repovoamento por espermatogônias (g) e presença de espermatozoides residuais (z) e poucos cistos com espermatídes (t); E – estágio de regeneração, abundância de espermatogônias (g) que indicam o repovoamento dos túbulos. FONTE: O autor (2017).

4.2.2 *Rhamdia voulezi*

Os dados biométricos dos machos de *R. voulezi* estão dispostos na TABELA 1. Neste grupo foi notado um crescimento regular até dezembro de 2016, após foram registradas variações das médias aferidas de comprimento padrão e peso corporal,

sendo a maior média registrada em fevereiro de 2016 ($p < 0,05$). As gônadas atingiram o maior peso nos meses entre dezembro de 2015 e fevereiro de 2016 ($p < 0,05$).

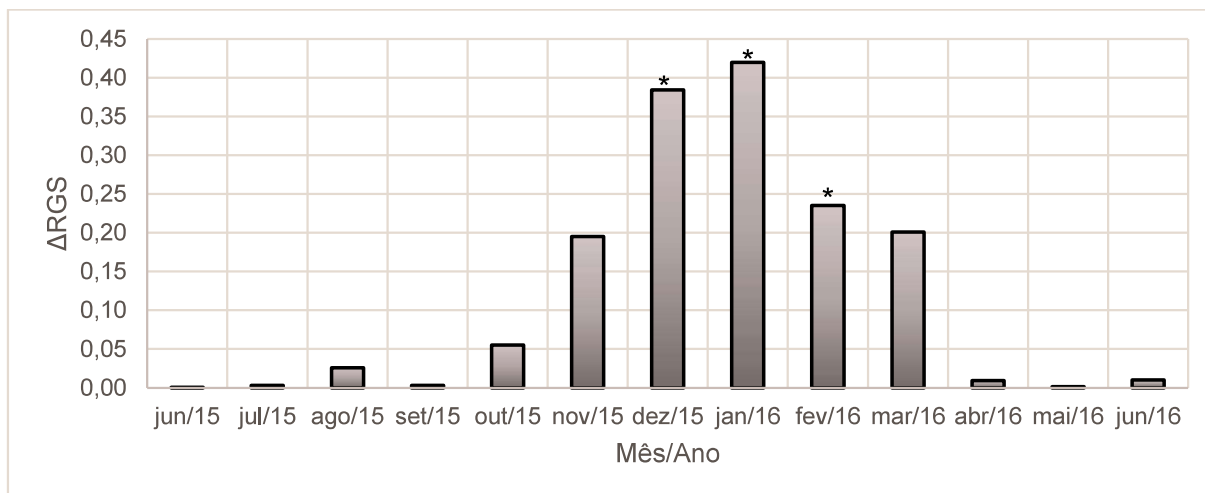
TABELA 1 – DADOS BIOMÉTRICOS DOS MACHOS DE *Rhamdia voulezi*, COLETADOS ENTRE JUNHO DE 2015 E JUNHO DE 2016.

Mês	Comprimento padrão (cm)	Peso corporal (g)	Peso gônada (g)	Δ RGs	n
Junho/2015	10,83 \pm 0,29	22,04 \pm 1,40	0,05 \pm 0,01	0,00 \pm 0,00	3
Julho/2015	13,50 \pm 0,50	38,96 \pm 4,26	0,20 \pm 0,14	0,00 \pm 0,00	3
Agosto/2015	12,33 \pm 1,04	34,99 \pm 12,08	0,18 \pm 0,10	0,03 \pm 0,02	3
Setembro/2015	15,35 \pm 0,49	54,08 \pm 1,19	0,30 \pm 0,28	0,00 \pm 0,00	2
Outubro/2015	16,40 \pm 1,01	64,32 \pm 10,98	1,44 \pm 0,30	0,06 \pm 0,02	3
Novembro/2015	16,10 \pm 0,85	63,68 \pm 10,23	2,63 \pm 0,95	0,19 \pm 0,24	2
Dezembro/2015	16,53 \pm 0,81	76,46 \pm 16,55	4,52 \pm 0,72*	0,38 \pm 0,08*	3
Janeiro/2016	14,33 \pm 2,52	49,41 \pm 22,86	3,13 \pm 1,11*	0,42 \pm 0,32*	3
Fevereiro/2016	17,37 \pm 2,32*	82,14 \pm 21,86*	3,97 \pm 1,88*	0,23 \pm 0,10*	3
Março/2016	14,23 \pm 0,64	44,11 \pm 6,27	1,81 \pm 1,24	0,21 \pm 0,20	3
Abril/2016	14,93 \pm 0,90	46,00 \pm 5,70	0,43 \pm 0,25	0,01 \pm 0,01	3
Mai/2016	14,20 \pm 1,47	42,86 \pm 11,68	0,14 \pm 0,02	0,00 \pm 0,00	3
Junho/2016	17,00 \pm 1,32	51,42 \pm 35,29	0,28 \pm 0,13	0,01 \pm 0,02	3

Média \pm desvio padrão; Δ RGs – relação gonadossomática; n – Número de animais; * indicam maiores médias ($p < 0,05$). FONTE: O autor (2017).

A relação gonadossomática começou a apresentar um aumento a partir do mês de outubro de 2015. O pico máximo foi registrado entre dezembro de 2015 e fevereiro de 2016 ($p < 0,05$) com uma diminuição abrupta em abril de 2016 e se manteve baixa nos meses seguintes (FIGURA 7).

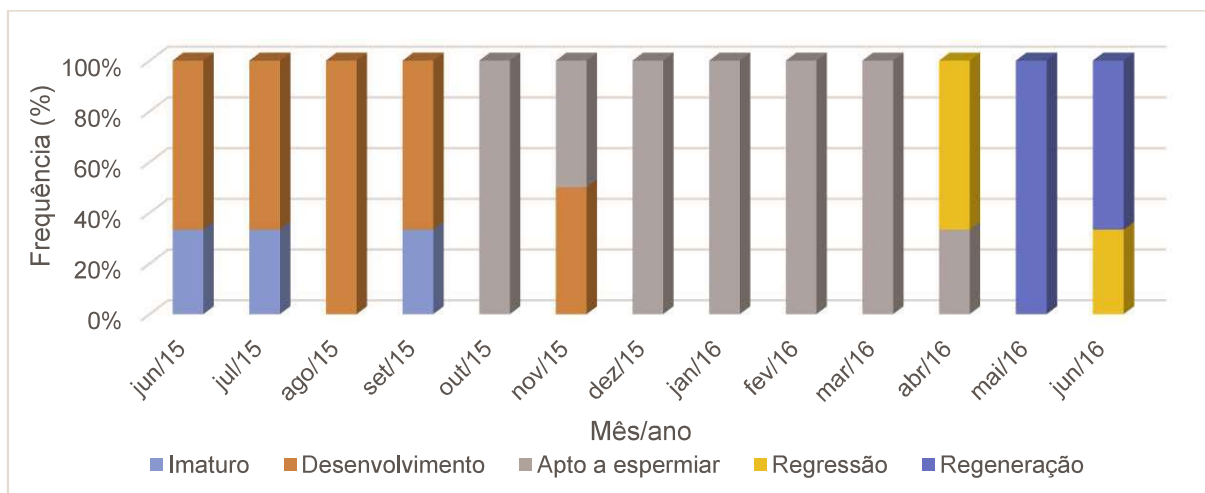
FIGURA 7 – VARIAÇÃO DA RELAÇÃO GONADOSSOMÁTICA DE MACHOS DE *Rhamdia voulezi* NO PERÍODO ENTRE JUNHO DE 2015 E JUNHO DE 2016.



* indicam maiores médias ($p < 0,05$). FONTE: O autor (2017).

Três animais jovens foram coletados nos três primeiros meses de coleta. Desde a primeira coleta foram identificados animais em maturação, o que demonstra que o processo de maturação ocorre logo no início da vida destes animais. Em outubro de 2015, com oito meses de idade, foram registrados os primeiros machos aptos a espermiar, condição frequente até março de 2016. A partir de abril de 2016 foram coletados animais com as gônadas em regressão por um curto período de tempo (abril e junho de 2016) e na sequência as gônadas entraram em regeneração se preparando para o próximo período reprodutivo (FIGURA 8).

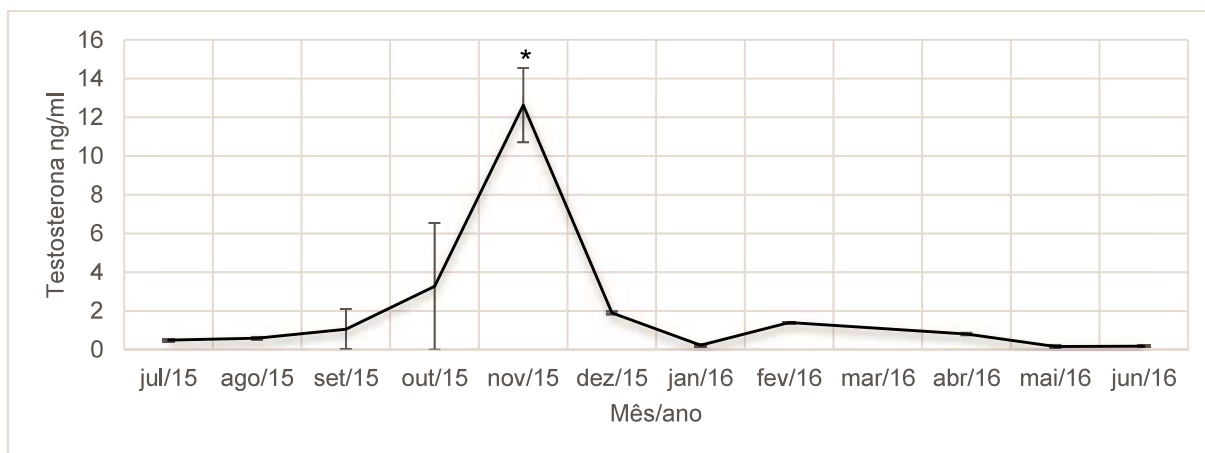
FIGURA 8 – DISTRIBUIÇÃO DAS FASES DE DESENVOLVIMENTO GONADAL DE MACHOS DE *Rhamdia voulezi* ENTRE OS MESES DE JUNHO DE 2015 A JUNHO DE 2016.



FONTE: O autor (2017).

Os níveis de testosterona plasmática variaram com um padrão próximo ao encontrado para o índice gonadossomático, o aumento da concentração começou em outubro de 2015 com pico em novembro de 2015 ($p<0,05$) e posterior queda e estabilização (FIGURA 9).

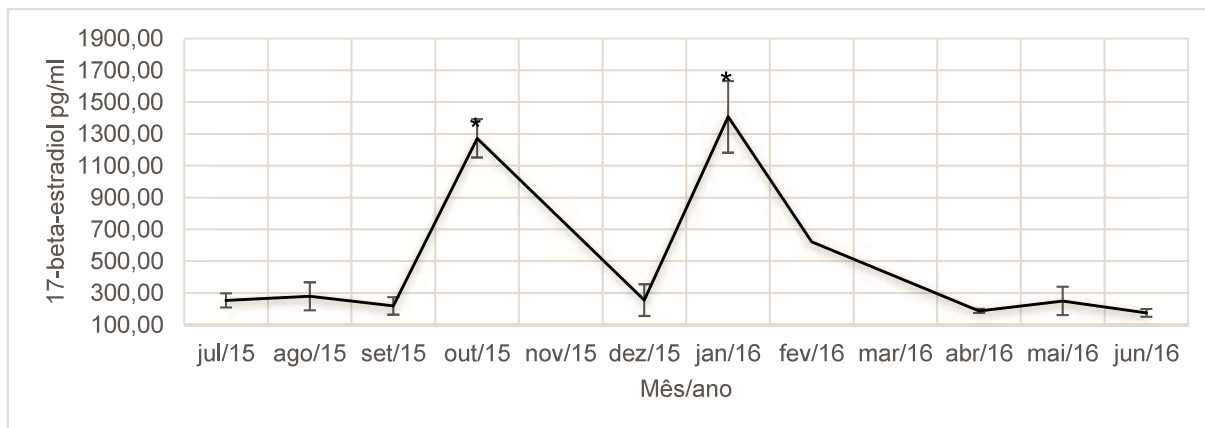
FIGURA 9 – VARIAÇÃO DOS NÍVEIS DE TESTOSTERONA PLASMÁTICA DE MACHOS DE *Rhamdia voulezi* ENTRE OS MESES DE JUNHO DE 2015 A JUNHO DE 2016.



* indicam maiores médias ($p<0,05$), barras verticais representam o desvio padrão. FONTE: O autor (2017).

Os níveis de 14-beta-estradiol plasmático aferidos apresentaram picos nos meses de outubro de 2015 e janeiro de 2016 ($p<0,05$) (FIGURA 10).

FIGURA 10 – VARIAÇÃO DOS NÍVEIS DE 17-BETA-ESTRADIOL PLASMÁTICO DE MACHOS DE *Rhamdia voulezi* ENTRE OS MESES DE JUNHO DE 2015 A JUNHO DE 2016.



* indicam maiores médias ($p<0,05$), barras verticais representam o desvio padrão. FONTE: O autor (2017).

A análise conjunta das informações coletadas demonstra que o período reprodutivo deste grupo de machos de *R. voulezi* ocorreu entre outubro de 2015 e março de 2016.

4.2.3 *Rhamdia branneri*

Dados dispostos na TABELA 2 representam os parâmetros biométricos coletados para machos de *R. branneri*. O crescimento também foi regular no período observado, porém com médias menores que as registradas para macho de *R. voulezi*, mantidos nas mesmas condições. As maiores médias ($p < 0,05$) para comprimento padrão, peso corporal e peso da gônada foram registradas em janeiro de 2016.

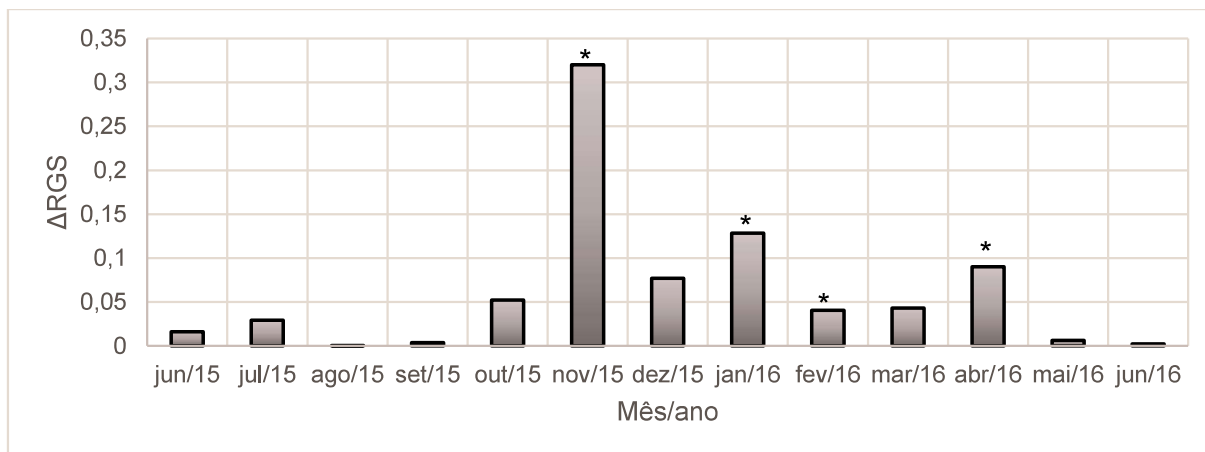
TABELA 2 - DADOS BIOMÉTRICOS DOS MACHOS DE *Rhamdia branneri*, COLETADOS ENTRE JUNHO DE 2015 E JUNHO DE 2016.

Mês	Comprimento padrão (cm)	Peso corporal (g)	Peso gônada (g)	Δ RGS	n
Junho	9,93 \pm 0,51	16,74 \pm 1,37	0,16 \pm 0,20	0,02 \pm 0,03	3
Julho	10,17 \pm 1,15	16,08 \pm 4,44	0,14 \pm 0,19	0,03 \pm 0,05	3
Agosto	10,17 \pm 0,76	19,20 \pm 4,05	0,05 \pm 0,07	0,00 \pm 0,00	2
Setembro	12,97 \pm 0,74	33,70 \pm 2,94	0,18 \pm 0,07	0,00 \pm 0,00	3
Outubro	12,80 \pm 0,40	29,50 \pm 3,73	0,32 \pm 0,16	0,05 \pm 0,04	3
Novembro	13,25 \pm 1,48	34,57 \pm 8,54	2,34 \pm 1,24	0,32 \pm 0,34*	2
Dezembro	13,77 \pm 1,53	45,40 \pm 14,80	0,87 \pm 0,84	0,08 \pm 0,12	3
Janeiro	16,40 \pm 0,14*	64,85 \pm 4,69*	2,17 \pm 0,57*	0,13 \pm 0,08*	2
Fevereiro	14,40 \pm 0,17	42,86 \pm 4,88	1,05 \pm 0,27	0,04 \pm 0,05*	3
Março	14,17 \pm 0,55	38,48 \pm 2,92	0,71 \pm 0,37	0,04 \pm 0,05	3
Abril	14,50 \pm 0,87	38,46 \pm 5,92	1,10 \pm 0,11	0,09 \pm 0,04*	3
Maio	13,00 \pm 1,32	30,71 \pm 8,75	0,19 \pm 0,11	0,01 \pm 0,01	3
Junho	14,27 \pm 1,08	37,31 \pm 6,86	0,18 \pm 0,06	0,00 \pm 0,00	3,00

Média \pm desvio padrão; Δ RGS – relação gonadossomática; n – Número de animais; * indicam maiores médias ($p < 0,05$). FONTE: O autor (2017).

A relação gonadossomática para os machos de *R. branneri* apresentou um comportamento variável, com picos ($p < 0,05$) no meses de novembro de 2015, janeiro, fevereiro e abril de 2016, com posterior queda e estabilização nos meses de maio e abril (FIGURA 11).

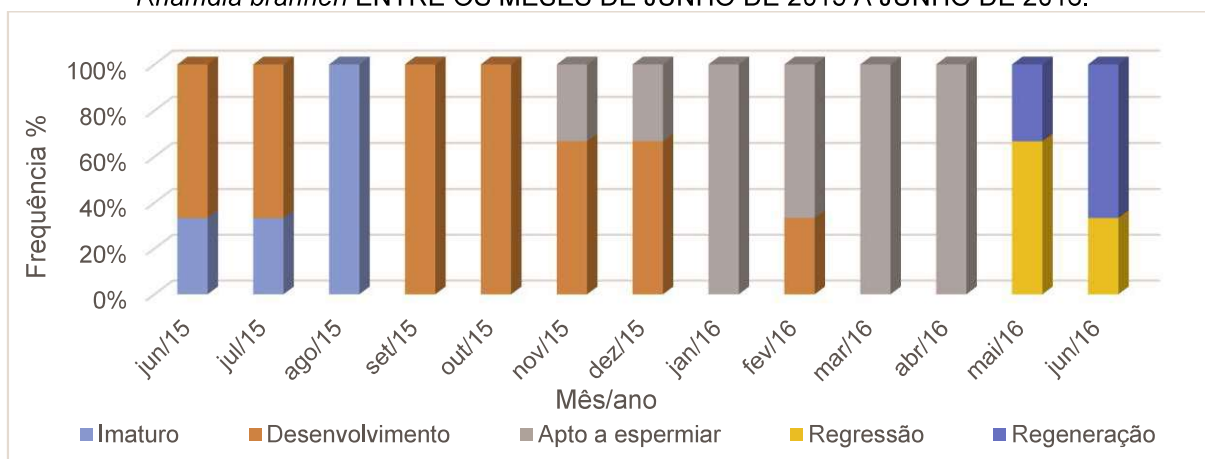
FIGURA 11 – VARIAÇÃO DA RELAÇÃO GONADOSSOMÁTICA DE MACHOS DE *Rhamdia branneri* NO PERÍODO ENTRE JUNHO DE 2015 E JUNHO DE 2016.



* indicam maiores médias ($p < 0,05$). FONTE: O autor (2017).

Animais imaturos foram coletados até agosto de 2015, neste período também foram identificados machos em maturação, porém em menor proporção. A partir de setembro de 2015 não foram mais registrados animais jovens. Os primeiros machos aptos a espermiar foram coletados em novembro de 2015, com maior frequência a partir de janeiro de 2016, cessando em maio de 2016. Na sequência, em maio e junho de 2016 foram coletados animais em regressão e regeneração (FIGURA 12).

FIGURA 12 – DISTRIBUIÇÃO DAS FASES DE DESENVOLVIMENTO GONADAL DE MACHOS DE *Rhamdia branneri* ENTRE OS MESES DE JUNHO DE 2015 A JUNHO DE 2016.



FONTE: O autor (2017).

A concentração de testosterona plasmática apresentou maior média ($p < 0,05$) em novembro de 2015, coincidindo com o pico da relação gonadosomática, logo

após, foi registrada uma queda das médias. Em janeiro de 2016 aconteceu um aumento dos valores e posterior estabilização até abril de 2016, quando novamente caíram (FIGURA 13).

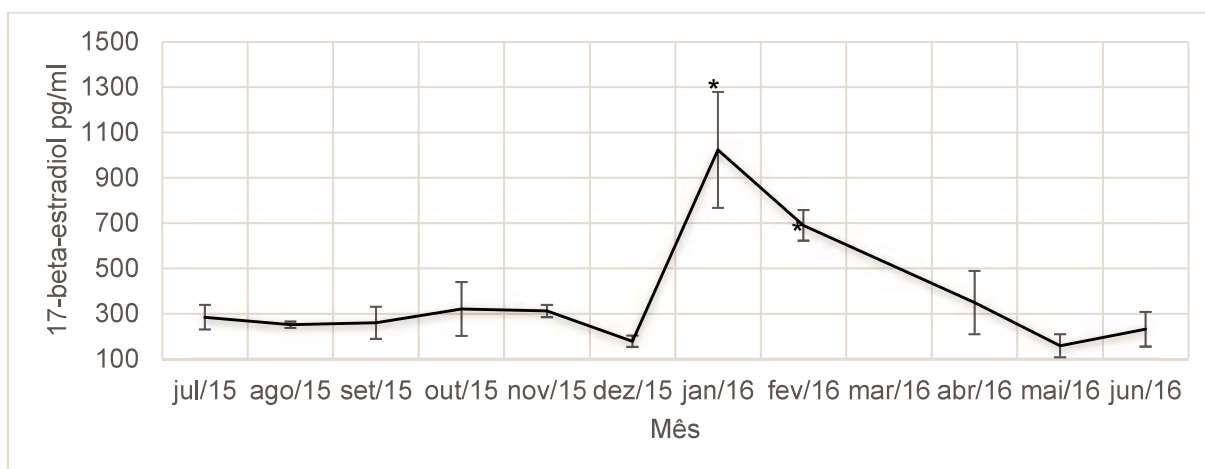
FIGURA 13 – VARIAÇÃO DOS NÍVEIS DE TESTOSTERONA PLASMÁTICA DE MACHOS DE *Rhamdia branneri* ENTRE OS MESES DE JUNHO DE 2015 A JUNHO DE 2016.



* indicam maiores médias ($p < 0,05$), barras verticais representam o desvio padrão. FONTE: O autor (2017).

As médias da concentração de 17-beta estradiol plasmático para machos de *R. branneri* se mantiveram constantes até dezembro de 2015. Em janeiro e fevereiro de 2016 foram registrados picos da média ($p < 0,05$) da concentração e posterior queda escalonada até o fim do experimento (FIGURA 14).

FIGURA 14 – VARIAÇÃO DOS NÍVEIS DE 17-BETA-ESTRADIOL PLASMÁTICO DE MACHOS DE *Rhamdia branneri* ENTRE OS MESES DE JUNHO DE 2015 A JUNHO DE 2016.



* indicam maiores médias ($p < 0,05$), barras verticais representam o desvio padrão. FONTE: O autor (2017).

Para machos de *R. branneri* os dados coletados apontam para um período reprodutivo entre novembro de 2015 e abril de 2016. Se comparados aos machos de *R. voulezi*, apresentaram um desenvolvimento mais tardio.

4.3 FÊMEAS

4.3.1 CICLO REPRODUTIVO

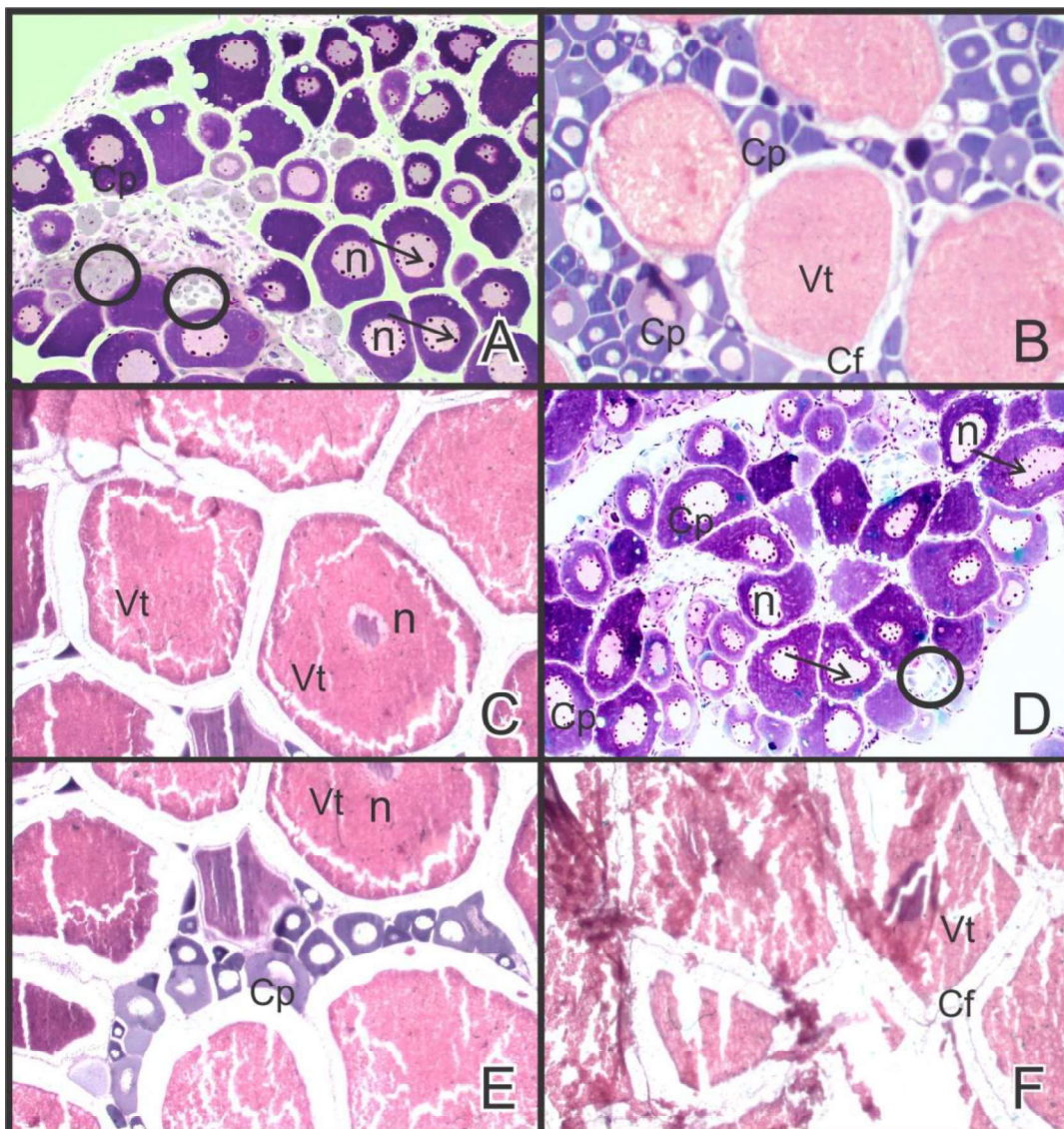
Não foram identificadas todas as fases do ciclo reprodutivo para as fêmeas das espécies estudadas, sendo a fase de desenvolvimento a mais frequente.

Quando na fase imatura, observados macroscopicamente, as fêmeas apresentaram gônadas finas e translúcidas. Microscopicamente, foi observada apenas a presença de ovogônias e ovócitos em crescimento primário (FIGURAS 15 A e 15 D).

As características da fase de desenvolvimento são: ovários apresentando maior volume, em relação aos de fêmeas jovens, e com coloração mais opaca. As estruturas internas começam a se diferenciar com a presença de ovócitos vitelogênicos primários e secundários (FIGURAS 15 B e 15 E).

Fêmeas aptas a desovar apresentaram ovários grandes e túrgidos (FIGURAS 15 C e 15 F), com grande presença de ovócitos vitelogênicos terciários e aumento da camada folicular (FIGURA 15 F), algumas fêmeas liberaram ovócitos quando submetidas a leve pressão na região abdominal no sentido cefalocaudal.

FIGURA 15 – LÂMINAS HISTOLÓGICAS E OVÁRIOS DE FÊMEAS DE *Rhamdia voulezi* E *R. branneri*.



Rhamdia voulezi: A – estágio imatura: n= núcleo; c= citoplasma, → nucléolos periféricos. Cp= ovócitos em crescimento primário; área circulada indicando os ninhos de ovogônias (objetiva 40x). B – fase de desenvolvimento, presença de ovócitos vitelogênicos em crescimento primário (Cp) e secundário (Vt) e visualização da camada folicular (Cf) (objetiva 40x). C – fase apta a desovar, presença de ovócitos vitelogênicos terciários (Vt), n: núcleo (objetiva 10x). *R. branneri*: D – estágio imatura: n= núcleo; c= citoplasma, → nucléolos periféricos. Cp= ovócitos em crescimento primário; área circulada indicando os ninhos de ovogônias (objetiva 40x). E – fase de desenvolvimento, presença de ovócitos vitelogênicos em crescimento primário (Cp) e secundário (Vt) (objetiva 40x). F – fase apta a desovar, presença de ovócitos vitelogênicos terciários (Vt), n: núcleo; cf: células foliculares (objetiva 10x). Coloração HE em todas as lâminas. FONTE: O autor (2017).

4.3.2 *Rhamdia voulezi*

Dados biométricos das fêmeas de *R. voulezi* estão apresentados na TABELA 3. Fêmeas de *R. voulezi* apresentaram o mesmo aspecto geral que os machos. O maior ($p < 0,05$) comprimento padrão médio foi registrado em janeiro de 2016. Os maiores ($p < 0,05$) pesos corporais e pesos das gônadas médios foram registrados em dezembro de 2015 e janeiro de 2016. O pico ($p < 0,05$) da relação gonadossomática ocorreu em março de 2016.

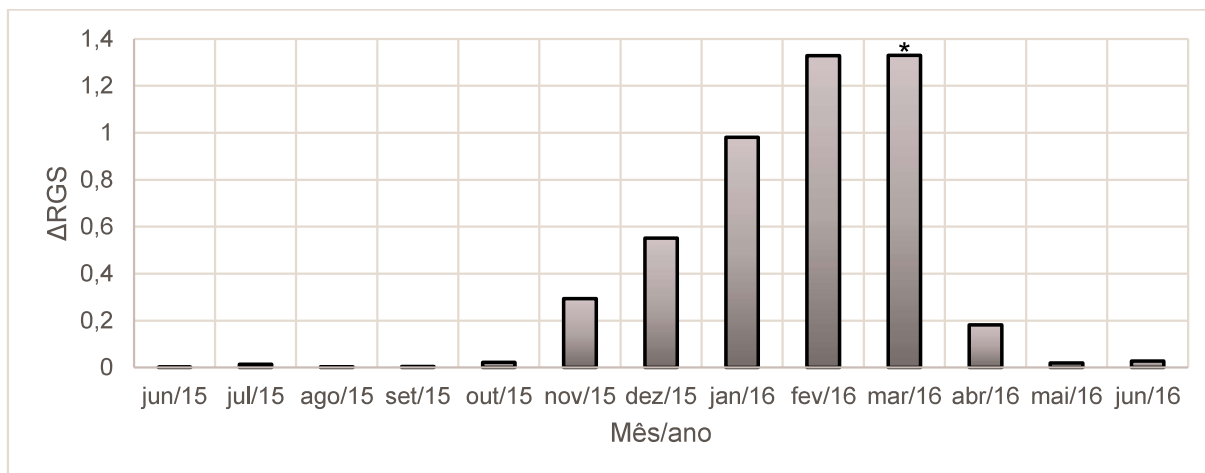
TABELA 3 - DADOS BIOMÉTRICOS DAS FÊMEAS DE *Rhamdia voulezi*, COLETADAS ENTRE JUNHO DE 2015 E JUNHO DE 2016.

Mês	Comprimento padrão (cm)	Peso corporal (g)	Peso gônada (g)	Δ RGS	n
Junho	10,67 \pm 1,44	21,08 \pm 8,72	0,05 \pm 0,03	0,00 \pm 0,00	3
Julho	11,75 \pm 0,35	26,01 \pm 1,03	0,25 \pm 0,29	0,01 \pm 0,02	2
Agosto	9,67 \pm 0,72	15,50 \pm 1,98	0,09 \pm 0,07	0,00 \pm 0,00	3
Setembro	16,53 \pm 1,05	66,08 \pm 10,84	0,53 \pm 0,10	0,00 \pm 0,00	3
Outubro	15,63 \pm 1,91	60,69 \pm 16,65	0,72 \pm 0,22	0,02 \pm 0,03	3
Novembro	15,83 \pm 0,76	60,92 \pm 5,16	3,47 \pm 0,83	0,29 \pm 0,22	3
Dezembro	17,00 \pm 2,60	91,21 \pm 37,60*	6,80 \pm 4,41*	0,55 \pm 0,27	3
Janeiro	16,90 \pm 4,32*	73,12 \pm 35,27*	6,24 \pm 3,54*	0,98 \pm 0,42	3
Fevereiro	18,73 \pm 3,16	94,18 \pm 34,44	0,72 \pm 0,09	1,33 \pm 2,28	3
Março	14,83 \pm 0,76	48,80 \pm 4,76	3,53 \pm 2,17*	1,33 \pm 0,33*	3
Abril	16,33 \pm 3,18	58,32 \pm 35,20	2,34 \pm 1,48	0,18 \pm 0,11	3
Maio	15,17 \pm 1,26	49,61 \pm 9,05	0,82 \pm 0,06	0,02 \pm 0,02	3
Junho	15,83 \pm 3,33	80,15 \pm 4,43*	1,31 \pm 0,14	0,03 \pm 0,01	3

Média \pm desvio padrão; Δ RGS – relação gonadossomática; n – Número de animais; * indicam maiores médias ($p < 0,05$). FONTE: O autor (2017).

A relação gonadossomática das fêmeas de *R. voulezi* começou a apresentar aumento no mês de novembro, com pico ($p < 0,05$) em fevereiro de 2016. No mês de abril ocorreu uma queda brusca no índice com diminuição gradual até o fim das coletas (FIGURA 16).

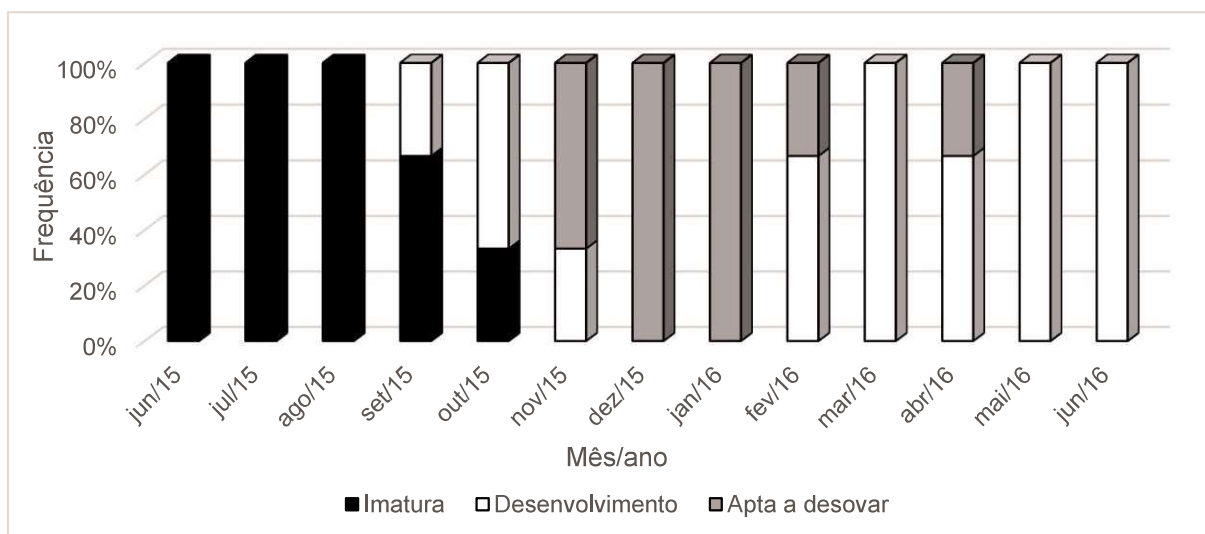
FIGURA 16 – VARIAÇÃO DA RELAÇÃO GONADOSSOMÁTICA DE FÊMEAS DE *Rhamdia voulezi* NO PERÍODO ENTRE JUNHO DE 2015 E JUNHO DE 2016.



FONTE: O autor (2017).

Durante os quatro primeiros meses de coleta predominou a ocorrência de fêmeas imaturas. Fêmeas em maturação foram coletadas entre setembro e novembro de 2015, com maior frequência em outubro de 2015. Em novembro ocorreram as primeiras fêmeas aptas a desovar, condição que se estendeu até fevereiro, porém com maior frequência em dezembro de 2015 e janeiro de 2016. Após esse período voltaram a ser registradas fêmeas em maturação (FIGURA 17).

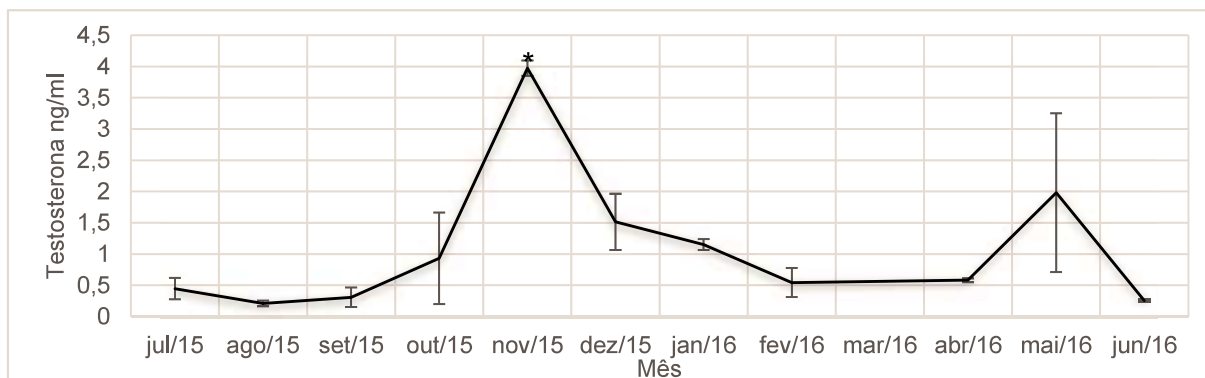
FIGURA 17 – DISTRIBUIÇÃO DAS FASES DE DESENVOLVIMENTO GONADAL DE FÊMEAS DE *Rhamdia voulezi* ENTRE OS MESES DE JUNHO DE 2015 A JUNHO DE 2016.



FONTE: O autor (2017).

O pico ($p<0,05$) dos níveis de testosterona plasmática para fêmeas de *R. voulezi* ocorreu em novembro de 2015. Logo após ocorreu uma queda das médias, porém os valores se mantiveram mais altos que os encontrados no início do experimento até diminuírem em junho de 2016 (FIGURA 18).

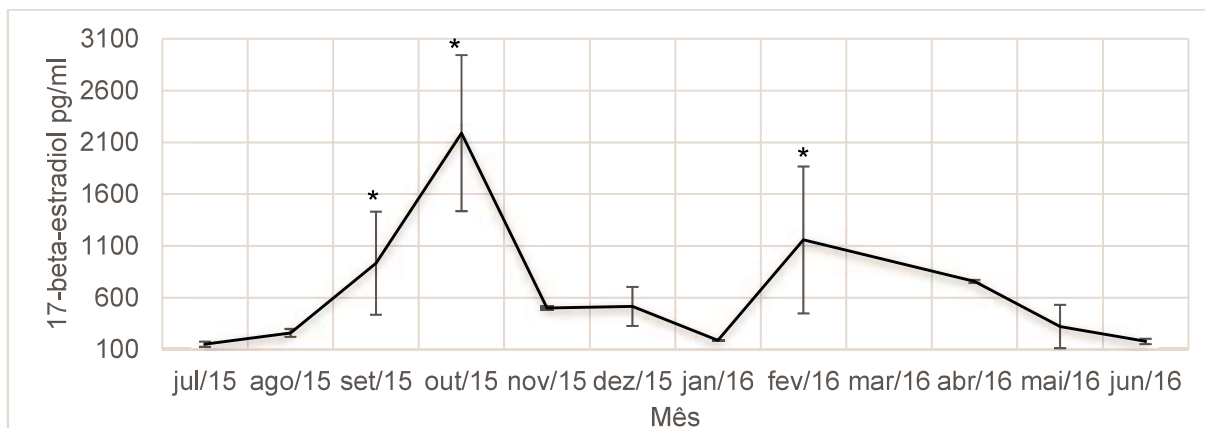
FIGURA 18 – VARIAÇÃO DOS NÍVEIS DE TESTOSTERONA PLASMÁTICA DE FÊMEAS DE *Rhamdia voulezi* ENTRE OS MESES DE JUNHO DE 2015 A JUNHO DE 2016.



* indicam maiores médias ($p<0,05$), barras verticais representam o desvio padrão. FONTE: O autor (2017).

As maiores médias ($p<0,05$) para a concentração de 17-beta-estradiol plasmático ocorreram em setembro e outubro de 2015 e em fevereiro de 2016, coincidindo com o primeiro registro da fase em maturação. Após fevereiro os valores médio diminuíram de forma gradual (FIGURA 19).

FIGURA 19 – VARIAÇÃO DOS NÍVEIS DE 17-BETA-ESTRADIOL PLASMÁTICO DE FÊMEAS DE *Rhamdia voulezi* ENTRE OS MESES DE JUNHO DE 2015 A JUNHO DE 2016.



* indicam maiores médias ($p<0,05$), barras verticais representam o desvio padrão. FONTE: O autor (2017).

Considerando os dados apresentados para relação gonadossomática, distribuição de fases de maturação gonadal, o período reprodutivo das fêmeas de *R. voulezi* estudadas ocorreu entre os meses de novembro de 2015 a fevereiro de 2016.

4.3.3 *Rhamdia branneri*

Apesar de mantidos em condições próximas os exemplares de *R. branneri* apresentaram menor crescimento se comparados a *R. voulezi*. Fêmeas de *R. branneri* também apresentaram aspecto saudável e o mesmo comportamento de crescimento que os demais animais (TABELA 4). O comprimento padrão apresentou grande variação de tamanho com maiores médias ($p < 0,05$) em janeiro, março e maio de 2016. O peso corporal médio e peso da gônada registraram maior média ($p < 0,05$) em janeiro de 2016.

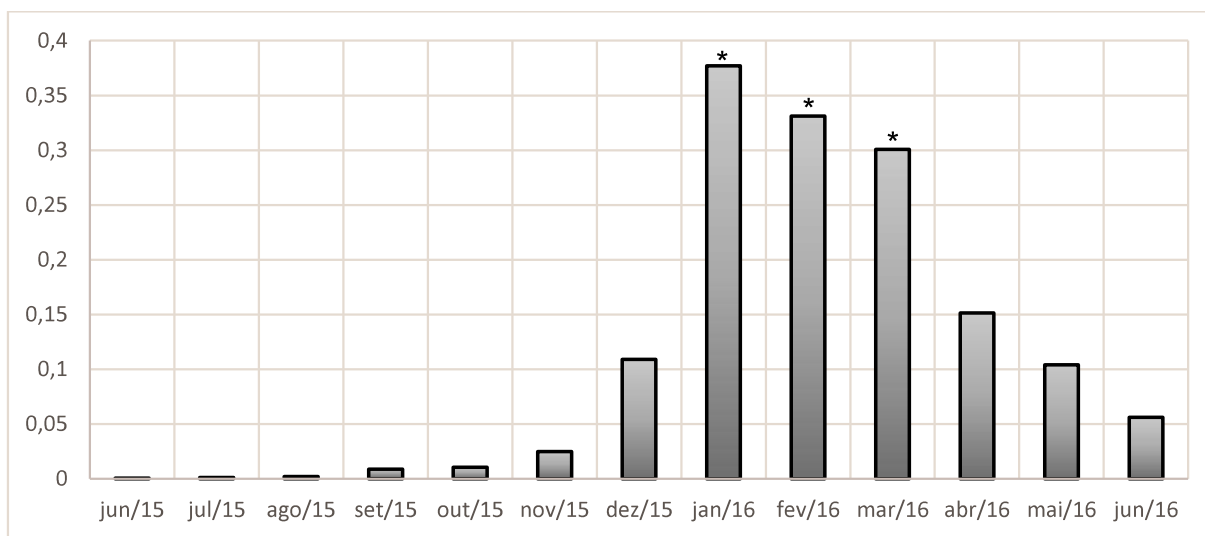
TABELA 4 – DADOS BIOMÉTRICOS DAS FÊMEAS DE *Rhamdia branneri*, COLETADOS ENTRE JUNHO DE 2015 E MAIO DE 2016.

Mês	Comprimento padrão (cm)	Peso corporal (g)	Peso gônada (g)	Δ RGS	n
Junho	10,33 \pm 0,29	17,26 \pm 1,54	0,04 \pm 0,02	0,00 \pm 0,00	3
Julho	9,27 \pm 1,42	13,05 \pm 5,18	0,04 \pm 0,05	0,00 \pm 0,00	3
Agosto	10,10 \pm 0,14	16,10 \pm 0,42	0,06 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	3
Setembro	13,33 \pm 0,76	34,98 \pm 6,91	0,35 \pm 0,07	0,01 \pm 0,01	3
Outubro	12,23 \pm 0,46	27,65 \pm 4,89	0,49 \pm 0,42	0,01 \pm 0,01	3
Novembro	14,83 \pm 1,15	41,73 \pm 7,90	0,53 \pm 0,13	0,02 \pm 0,01	3
Dezembro	14,60 \pm 1,04	49,00 \pm 11,44	1,54 \pm 1,63	0,11 \pm 0,16	3
Janeiro	16,07 \pm 1,37*	63,83 \pm 7,00*	3,66 \pm 0,63*	0,38 \pm 0,19*	3
Fevereiro	14,60 \pm 1,28	47,15 \pm 14,95	2,70 \pm 1,99	0,33 \pm 0,29*	3
Março	14,73 \pm 1,27*	43,92 \pm 9,25	2,25 \pm 0,60	0,30 \pm 0,18*	3
Abril	12,20 \pm 1,39	23,74 \pm 9,12	0,93 \pm 0,64	0,15 \pm 0,10	3
Maio	13,77 \pm 2,64*	40,84 \pm 22,65	1,51 \pm 1,10	0,10 \pm 0,09	3
Junho	14,43 \pm 0,81	40,31 \pm 4,81	0,93 \pm 0,11	0,06 \pm 0,01	3

Média \pm desvio padrão; Δ RGS – relação gonadossomática; n – Número de animais; * indicam maiores médias ($p < 0,05$). FONTE: O autor (2017).

A relação gonadossomática apresentou comportamento diferente que o das fêmeas de *Rhamdia voulezi*, o aumento do índice iniciou no mês de dezembro de 2015, com pico ($p < 0,05$) em janeiro de 2016 quando iniciou uma diminuição contínua (FIGURA 20).

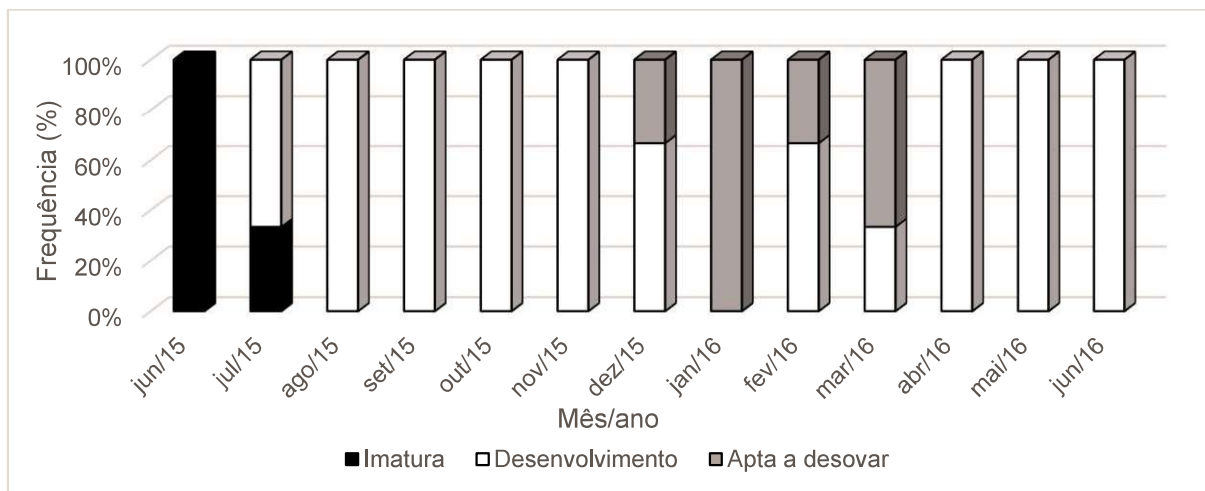
FIGURA 20 – VARIAÇÃO DA RELAÇÃO GONADOSSOMÁTICA DE FÊMEAS DE *Rhamdia voulezi* NO PERÍODO ENTRE JUNHO DE 2015 E JUNHO DE 2016.



FONTE: O autor (2017).

O período em que foram coletadas fêmeas imaturas foi mais curto quando comparado com fêmeas de *R. voulezi*. Teve a duração até julho de 2015. Na sequência, até dezembro de 2015, a predominância foi de fêmeas em estágio de maturação. O período de coleta de animais aptos a desovar foi mais tardio, iniciou em dezembro de 2015, porém teve maior duração se comparado com *R. voulezi*, até março de 2016. Após este período a ocorrência de animais em maturação voltou a ser registrada até o fim do experimento (FIGURA 21)

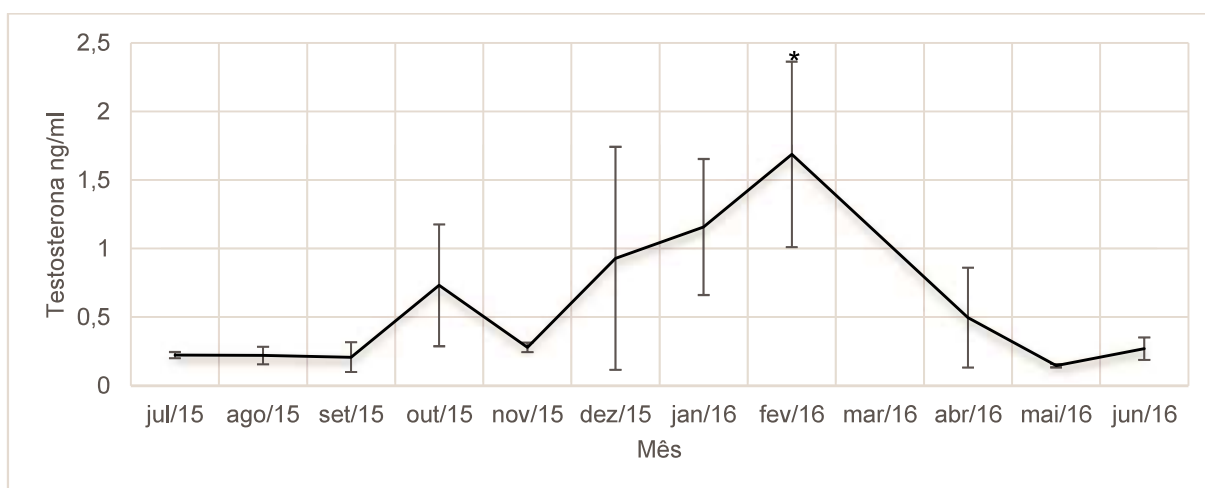
FIGURA 21 – DISTRIBUIÇÃO DAS FASES DE DESENVOLVIMENTO GONADAL DE FÊMEAS DE *Rhamdia branneri* ENTRE OS MESES DE JUNHO DE 2015 A JUNHO DE 2016.



FONTE: O autor (2017).

O ápice da concentração de testosterona plasmática para fêmeas de *R. branneri* aconteceu em fevereiro de 2016, porém com grande variação nos demais meses (FIGURA 22).

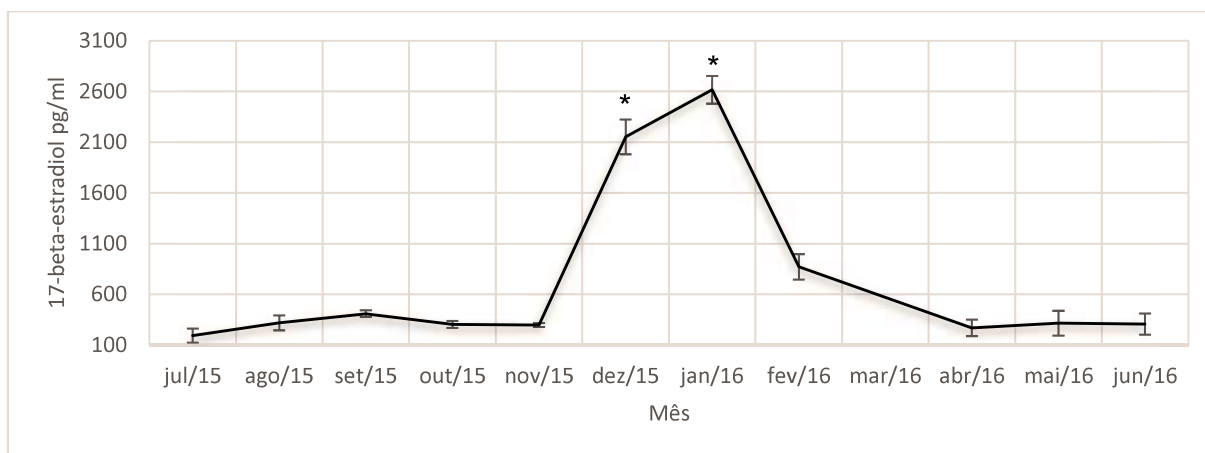
FIGURA 22 – VARIAÇÃO DOS NÍVEIS DE TESTOSTERONA PLASMÁTICA DE FÊMEAS DE *Rhamdia branneri* ENTRE OS MESES DE JUNHO DE 2015 A JUNHO DE 2016.



* indicam maiores médias ($p < 0,05$), barras verticais representam o desvio padrão. FONTE: O autor (2017).

A variação da concentração de 17-beta-estradiol foi mais regular com pico em dezembro de 2015 e janeiro de 2016, em coincidência com o registro das fêmeas aptas a desovar (FIGURA 23).

FIGURA 23 – VARIAÇÃO DOS NÍVEIS DE 17-BETA-ESTRADIOL PLASMÁTICO DE FÊMEAS DE *Rhamdia branneri* ENTRE OS MESES DE JUNHO DE 2015 A JUNHO DE 2016.



* indicam maiores médias ($p < 0,05$), barras verticais representam o desvio padrão. FONTE: O autor (2017).

Fêmeas aptas a desovar foram menos frequentes que para *R. voulezi*, porém o período reprodutivo teve a mesma duração de 4 meses, de dezembro de 2015 a março de 2016.

4.3 ANORMALIDADES

Em dezembro de 2015 foi coletada uma fêmea de *R. voulezi* com desenvolvimento irregular das gônadas. Um dos ovários se desenvolveu, enquanto outro ficou atrofiado (FIGURA 24). Apesar do fato os dados do IGS indicam que houve um crescimento compensatório deste ovário. Uma fêmea normal com o mesmo comprimento padrão de 15,5cm apresentou o IGS de 6,20% enquanto a fêmea que apresentou a anormalidade apresentou o IGS de 6,01%. Apesar da atrofia a fêmea atingiu o estágio apta a desovar.

FIGURA 24 – OVÁRIO DE *Rhamdia voulezi* COM CRESCIMENTO IRREGULAR, GÔNADA ATROFIADA NA POSIÇÃO INFERIOR DA IMAGEM.



FONTE: O autor (2017).

5 DISCUSSÃO

Características morfológicas de dimorfismo sexual, como o aspecto das gônadas e papilas urogenitais podem ser notados em diversas espécies como, *Loricaria lentiginosa* Isbrücker, 1979 (GUIMARÃES-CRUZ et al., 2005), *Sciadeichthys luniscutis* Valenciennes 1840 e *Genidens genidens* Valenciennes 1839 (GOMES E ARAUJO, 2004). Essas características são importantes de serem observadas para evitar que variabilidades intraespecíficas sejam negligenciadas na tomada de decisões taxonômicas (PY-DANIEL e FERNANDES, 2005).

Em *R. quelen* as diferenças, como formato da papila urogenital e formato das gônadas observadas neste estudo, também foram notadas conforme relato de Ghiraldelli et al. (2007). Tais características são positivas em situação de manutenção e reprodução em cativeiro, já que facilitam a identificação dos reprodutores garantindo maior sucesso e facilidade na seleção de animais para reprodução controlada.

Nos machos a liberação de sêmen quando o indivíduo é submetido a leve pressão na região abdominal é característica de outras espécies de siluriformes, para machos de *Steindachneridion melanoderdatum* Garavello, 2005 é relatado que em procedimentos de reprodução artificial a seleção de machos criados em cativeiro é feita com a utilização deste procedimento (LUDWIG, GOMES e ARTONI, 2004). Para *R. quelen* tal fato é registrado em machos com idade superior a 7 meses, em animais criados em sistemas artificiais (GHIRALDELLI et al., 2007).

A presença de franjas ao longo do testículo não é característica exclusiva de *R. branneri* e *R. voulezi*, também são encontradas em outras espécies no grupo dos Siluriformes. As espécies *Pimelodus maculatus* Lacepède, 1803, *Iheringichtys labrosus* Lütken, 1874 e *Conorhynchus conirostris* Valenciennes, 1840 também apresentam estas características (CRUZ E SANTOS, 2004). Além disso a função de cada porção do testículo pode ser diferenciada, as franjas da região caudal de *P. maculatus* e *I. labrosus* são exclusivamente secretoras enquanto *C. conirostris* as franjas da região caudal também acumulam a função espermatogênica (CRUZ E SANTOS, 2004). Em algumas espécies de Siluriformes a presença de franjas nos testículos pode dificultar a reprodução em condição de cativeiro, já que as características morfológicas impedem que o sêmen seja conduzido até a papila

urogenital através de massagem abdominal (DAMASCENO, 2014). Apesar das espécies aqui analisadas apresentarem liberação de sêmen de forma relativamente fácil, o entendimento da função de cada porção dos testículos possibilita aumentar a eficiência na reprodução em cativeiro.

As características sexuais observadas para as fêmeas, como, papila genital hiperemiada, aumento do volume ventral, se comparado ao volume ventral de machos, e mudança da turgidez do ventre, também foram registradas em fêmeas de *R. quelen* no período reprodutivo (GHIRALDELLI et al., 2007). Estas características são utilizadas na seleção de fêmeas aptas a serem submetidas a reprodução artificial de diversas espécies como *R. quelen* (BOMBARDELLI et al., 2006), *Steindachneridion parahybae* Steindachner, 1877 (OKAWARA et al., 2015) e *Rhinelepis aspera* Agassiz, 1829 (BOMBARDELLI et al., 2013). Tal procedimento em muitos casos não garante a seleção de fêmeas aptas a reprodução de forma eficiente, o que leva a uma diminuição dos índices de sucesso, sendo importante a aferição de outros parâmetros de atividade reprodutiva, como a variação da concentração plasmática de esteroides sexuais (ARCAND-HOY e BENSON, 1998). Técnica que, no caso deste estudo, se mostrou adequada, já que os picos hormonais ocorreram em coincidência com a maior atividade reprodutiva.

A análise dos dados de crescimento mostra um crescimento baixo e irregular se comparados aos resultados apresentados em estudos zootécnicos realizados com a espécie *R. voulezi*. Para animais alimentados com ração orgânica e convencional, ambas com 36% de proteína bruta, com frequência de 4 vezes ao dia. O peso inicial dos animais foi de $15,01 \pm 3,32$ g a após 78 dias de experimento atingiram o peso de $52,81 \pm 6,75$ g e $55,59 \pm 5,91$ g, respectivamente (FEIDEN et al., 2010). Tal fato pode ser explicado pelo manejo alimentar adotado, os animais foram tratados com menor frequência e menor quantidade de ração. Dados sobre o crescimento de *R. branneri* em condições de cativeiro não foram encontrados para comparação.

Além da menor taxa e frequência de alimentação, o manejo constante dos animais pode dificultar seu crescimento devido ao estresse causado. Tal fato é relevante porém nenhuma interferência nos padrões reprodutivos foi notada durante o período experimental. Para *S. melanoderdatum*, em um grupo de animais mantidos em cativeiro, a irregularidade da variação do crescimento ao longo dos meses também

foi notada, o que pode ser explicado pela influência do manejo ou o processo de coleta aleatório (TESSARO, 2015).

Para *R. voulezi* a relação gonadosossomática variou entre 0,0005 e 0,4197, para machos, e entre 0,0008 e 1,3302 para fêmeas. Em *R. branneri* a relação gonadosossomática variou entre 0,0001 e 0,4773, para machos, e entre 0,0005 e 0,3772 para fêmeas. Esta variação demonstra clara diferença entre as espécies em que fêmeas de *R. voulezi* tiveram um maior crescimento das gônadas em comparação com *R. branneri*. Para machos os valores se mantiveram próximos para as duas espécies. Comparando com outros estudos com espécies do mesmo gênero temos os valores registrados para *R. quelen*, entre 0,29 e 9,16, para machos, e de 0,11 a 13,03 para fêmeas (GHIRALDELLI et al., 2007). Sendo claramente maiores que os encontrados neste estudo.

O modelo teórico proposto por Brown-Peterson et al., (2011), se mostrou adequado para descrever os eventos relacionados à maturação gonadal e modificação dos aspectos visuais das gônadas de *R. branneri* e *R. voulezi*.

Para machos foi possível identificar todas as fases do ciclo reprodutivo, porém poucos animais jovens foram registrados em ambas as espécies. Fato que demonstra o rápido desenvolvimento gonadal de machos, pois animais jovens foram coletados até o sexto mês de vida para *R. voulezi* e até o sétimo para *R. branneri*.

O ciclo reprodutivo dos machos seguiu um padrão que pode ser considerado dentro da normalidade. Animais aptos a espermiar tiveram maior frequência de registro nos meses mais quentes do ano, sendo outubro a março para *R. voulezi* e novembro a abril para *R. branneri*. Animais da espécie *R. quelen*, criados em cativeiro apresentam o mesmo comportamento dos animais do presente estudo (GHIRALDELLI et al. 2007).

A ocorrência de anastomose nos cistos, como aqui verificado, é indicativo da chegada no estágio final de maturação (GRIER e TAYLOR, 1998). Fato registrado também para outras espécies de Siluriformes como: *L. lentiginosa* (GUIMARÃES-CRUZ, 2005) e *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1877 (BARROS, et al., 2007).

Os eventos de desenvolvimento morfológicos das gônadas observados para os machos de ambas as espécies foram condizentes com o processo de

espermatogênese conhecido. Tal processo basicamente consiste na diferenciação de espermatogônias diploides em espermatozoides maduros no final do processo. Esse processo ocorre desencadeado pela liberação de hormônios reprodutivos, consistindo no povoamento do entorno das espermatogônias por células de Sertoli, formando assim um cisto, onde ocorrem os processos de multiplicação e diferenciação, culminando na abertura dos cistos e liberação dos espermatozoides (SCHULZ et al., 2010). A visualização dos eventos da espermatogênese possibilitou a caracterização do ciclo reprodutivo de forma completa durante o desenvolvimento dos testículos através da diferenciação das diversas fases (BROWN-PETERSON et al., 2011).

Para os machos de ambas as espécies a entrada nas fases de regressão e regeneração ocorreu no mês de maio de 2016. Neste mesmo período a temperatura média atmosférica apresentou uma grande variação, passando de 23,4°C em abril para 16,7°C em maio (SIMEPAR, 2016), fato que corrobora com a ideia de que a atividade reprodutiva de *R. branneri* e *R. voulezi* é fortemente influenciada pela variação da temperatura ambiental e tem seu período de maior atividade nos meses mais quentes da primavera e verão. Esta influência da temperatura na atividade reprodutiva também foi registrada para *R. quelen*, onde os picos reprodutivos se concentraram nos meses mais quentes (GHIRALDELLI et al., 2007).

O registro dos maiores níveis de esteroides plasmáticos ocorreu em coincidência com o aumento da frequência de registro de machos em maturação e aptos a espermiar e também com os picos da relação gonadossomática. Isso ocorre após liberação das gonatrofins pelas gônadas que são estimuladas a produzirem os esteroides sexuais que regulam a espermatogênese sendo esperado que o aumento da atividade reprodutiva esteja relacionado ao aumento dos níveis plasmáticos destes hormônios (MYLONAS; FOSTIER e ZANUY, 2010; TARANGER et al., 2010).

Para machos de *S. melanodermatum*, peixe também endêmico da bacia do Rio Iguaçu, a variação da concentração plasmática de esteroides sexuais também ocorreu de acordo com a forma descrita. Os picos hormonais ocorrem em coincidência com os picos do índice gonadossomático, sendo observado a diminuição no período em que foram registrados animais nas fases de regressão e regeneração (TESSARO, 2015)

Fêmeas de ambas as espécies foram consideradas aptas a desovar. Além disso, não foram observados indícios da ocorrência de desova natural no período em que os animais foram observados, principalmente a presença de folículos pós-ovulatórios (GHIRALDELLI et al., 2007). O estímulo a desova depende de outros fatores ambientais como, pressão, temperatura, correntes aquáticas, entre outros que não são encontrados em condições de cativeiro e são difíceis de serem simulados (ZANIBONI FILHO E WEINGARTNER, 2007).

A não observação das fases de regressão e regeneração pode indicar que a manutenção da disponibilidade de ovócitos com capacidade reprodutiva ocorra por um período mais longo ou, ainda, que a duração destas fases seja muito curta e a periodicidade de coletas não permitiu a observação destas. Tal fato também foi observado para *R. quelen*, com estudo de material histológico proveniente de 58 fêmeas, mantidas em condição de cativeiro, que apresentou três fêmeas em fase de reabsorção dos ovócitos (GHIRALDELLI et al., 2007)

Além dos fatores relacionados à estratégia reprodutiva, fatores ambientais também podem ter influenciado na distribuição da frequência de ocorrência das fases de maturação gonadal. Diversos autores citam que em situação de cativeiro, outros fatores, como manejo e suprimento de uma dieta artificial adequada, também podem afetar o desenvolvimento gonadal (IZQUIERDO; FERNANDEZ-PALACIOS e TACON, 2001; SCHRECK; CONTRERAS-SANCHEZ e FITZPATRICK, 2001).

O período reprodutivo, baseado nas informações coletadas, para *R. voulezi* ocorreu entre outubro de 2015 e março de 2016. Para as fêmeas, mesmo estando em estágio de desenvolvimento, foram identificados animais aptos a desovar em novembro, caracterizando uma pequena diferença entre machos e fêmeas. O período reprodutivo observado é condizente com o relatado na literatura, como observado por Suzuki e Agostinho (1997) que relatam que o período reprodutivo dessa espécie, em condições naturais, se encontra entre setembro e fevereiro, com maior intensidade em novembro e dezembro.

Para *R. branneri* o período reprodutivo ocorreu entre novembro de 2015 a abril de 2016. Também foi observada a mesma diferença entre os sexos, fêmeas estavam aptas a desovar a partir de dezembro de 2015, enquanto machos aptos foram registrados a partir de novembro de 2015. Em ambiente natural, o período de

reprodução ocorre de setembro a março com maior frequência entre outubro e dezembro (SUZUKI e AGOSTINHO, 1997).

A idade em que foram registrados os primeiros animais maduros, nove meses para *R. branneri* e oito meses para *R. voulezi* é compatível com a idade registrada por outros trabalhos com espécies do gênero *Rhamdia*. Para *R. quelen*, foram coletados animais aptos a reprodução a partir de sete meses de idade e também apresentaram a característica de maior precocidade para machos (GHIRALDELLI et al., 2007).

O comprimento padrão em que foram registrados os primeiros animais da espécie *R. voulezi* aptos a reprodução foi de $16,4 \pm 1,01$ cm e $15,53 \pm 0,50$ cm, para macho e fêmeas, respectivamente. Em ambiente natural os primeiros animais em atividade reprodutiva foram registrados com o tamanho de 19 e 17 cm, para machos e fêmeas, respectivamente (BAUMGARTNER, et al., 2012). Para *R. branneri* o comprimento padrão registrado no início da atividade reprodutiva foi de $13,37 \pm 1,07$ e $14,6 \pm 1,04$ cm, para machos e fêmeas, respectivamente. Em ambiente natural machos iniciam a atividade reprodutiva com 11,2 cm e fêmeas com 14 cm (SUZUKI E AGOSTINHO, 1997).

A observação do aumento dos níveis de testosterona plasmática para fêmeas era esperada, embora o estradiol seja principalmente reconhecido como um hormônio feminino em peixes, e a testosterona é tipicamente reconhecida como um hormônio masculino na maioria dos teleósteos, sua presença é comum em machos e fêmeas em grandes quantidades. Além disso a testosterona é a precursora de diversos outros hormônios obtidos através do processo de aromatização (LE PAGE et al., 2010; SABET et al., 2016). Tal fato também foi notado em fêmeas de *S. melanoderdatum* (TESSARO, 2015).

As observações feitas neste trabalho indicam a possibilidade da utilização do acompanhamento da variação dos esteroides como forma de previsão da atividade reprodutiva, já que sua variação foi condizente com a evolução das fases de maturação gonadal.

A utilização de métodos não letais é prática recorrente em estudos de diversas áreas em peixes, como: a utilização de ultrassom na predição do estágio gonadal (ACHIONYE-NZEH e JIMOH, 2010; CREPALDI e ROTTA, 2006) e determinação dos

níveis de cortisol para inferência do nível de estresse em *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792 (ELLIS et al., 2004). A utilização do acompanhamento dos níveis plasmáticos da testosterona ou estradiol pode se caracterizar como um promissor método de estimativa do melhor período para a reprodução controlada das espécies estudadas.

Finalmente, quanto a anormalidade no desenvolvimento da gônada da fêmea coletada em dezembro de 2015 o fato pode ser considerado um evento isolado. Tal fato é registrado por outros autores. Gônadas de tamanho irregular entre si foram observadas em *S. melanodermetum* (TESSARO, 2015), *S. parahybae* (HONJI et al., 2013). e *R. quelen* (GHIRALDELLI et al., 2007) em animais mantidos em cativeiro.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de apresentarem baixo crescimento, machos e fêmeas de ambas as espécies apresentaram indícios de maturação gonadal nas condições e período do experimento, fato que pode ser considerado uma vantagem em trabalhos de manutenção das espécies em cativeiro.

Machos de *R. voulezi* e *R. branneri* entraram na puberdade poucos meses após o nascimento, atingiram a capacidade reprodutiva com cerca de 7 e 8 meses de idade, respectivamente. Estado que se manteve durante aproximadamente 6 meses. A observação da maior atividade reprodutiva ocorreu nos meses de primavera e verão.

Fêmeas de *R. voulezi* e *R. branneri* apresentaram desenvolvimento um pouco mais tardio em relação aos machos. A capacidade reprodutiva foi atingida com cerca de 9 meses de idade para *R. voulezi* e 10 meses para *R. branneri*. Também se manteve por um período relativamente longo, aproximadamente 4 meses, no período entre a primavera e o verão.

O modelo teórico utilizado para estabelecimento e comparação das fases de desenvolvimento gonadal se mostrou adequado para as espécies estudadas.

As variações dos esteroides plasmáticos 17-beta-estradiol e testosterona foram compatíveis com as alterações morfológicas das gônadas e a variação da relação gonadossomática em machos e fêmeas de ambas as espécies, nas condições do experimento, podendo servir como índice de atividade reprodutiva em situações de manutenção e reprodução em cativeiro.

O primeiro ciclo reprodutivo das espécies estudadas ocorreu no primeiro ano de vida dos animais. Considerando as observações feitas durante o experimento, o período reprodutivo das espécies estudadas é longo e se inicia na primavera e se estende até o fim do verão. Sendo que *R. branneri* possui um desenvolvimento pouco mais tardio, quando comparado a *R. voulezi*.

Em situações de manutenção e reprodução *ex-situ* é indicado que os procedimentos de reprodução artificial, já que não foram notados indícios de

reprodução espontânea em cativeiro, sejam conduzidos no período entre a primavera e o verão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUCARMA, M.; MARTINS-SANTOS, I. C. Karyotype and B chromosome of *Rhamdia* species (Pisces, Pimelodidae) endemic in the River Iguaçu basin. **Cytologia**, v. 66, n. 3, p. 299-306, 2001.

ACHIONE-NZEH, C. G.; JIMOH, K. O. Ultrasound evaluation of the gonads in catfish *Clarias gariepinus* (Teugels): An initial experience in Africa. **World Journal of Fish and Marine Sciences**, v. 2, n. 4, p. 343-347, 2010.

AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C.; VERÍSSIMO, S.; OKADA, E. K. Flood regime, dam regulation and fish in the Upper Paraná River: effects on assemblage attributes, reproduction and recruitment. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 14, p. 11-19, 2004.

ARCAND-HOY, L. D.; BENSON, W. H. Fish reproduction: an ecologically relevant indicator of endocrine disruption. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 17, n. 1, p. 49-57, 1998.

BARROS, M. D.; GUIMARÃES-CRUZ, R. J.; VELOSO-JÚNIOR, V. C.; SANTOS, J. E. D. Reproductive apparatus and gametogenesis of *Lophiosilurus alexandri* Steindachner (Pisces, Teleostei, Siluriformes). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 24, n. 1, p. 213-221, 2007.

BAUMGARTNER, G.; PAVANELLI, C. S.; BAUMGARTNER, D.; BIFI, A. G.; DEBONA, T.; FRANA, V. A. **Peixes do baixo rio Iguaçu**. Maringá: Editora da Universidade Estadual de Maringá - EDUEM. 2012.

BEÇAK, W.; PAULETE, J. **Técnicas de citologia e histologia**. v. 1. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora S.A. 1976.

BOMBARDELLI, R. A.; MÖRSCHBÄCHER, E. F.; CAMPAGNOLO, R.; SANCHES, E. A.; SYPERRECK, M. A. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá cinza, *Rhamdia Quelen* (Quoy & Gaimardm, 1824). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1251-1257, 2006.

BOMBARDELLI, R. A.; SANCHES, E. A.; BAGGIO, D. M.; SYKORA, R. M.; SOUZA, B. E.; TESSARO, L.; PIANA, P. A. Effects of the spermatozoa: oocyte ratio, water volume and water temperature on artificial fertilization and sperm activation of cascudo-preto. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 42, n. 1, p. 1-6, 2013.

BROWNE, R. K.; KAUROVA, S. A.; UTESHEV, V. K.; SHISHOVA, N. V.; MCGINNITY, D.; FIGIEL, C. R.; MANSOUR, N.; AGNEW, D.; WU, M.; GAKHOVA, E. N.; DZYUBA, B.; COSSON, J. Sperm motility of externally fertilizing fish and amphibians. **Theriogenology**, v. 83, p. 1-13, 2015.

BROWN-PETERSON, N. J.; WYANSKI, D. M.; SABORIDO-REY, F.; MACEWICZ, B. J.; LOWERRE-BARBIERI, S. K. A standardized terminology for describing reproductive development in fishes. **Marine and Coastal Fisheries**, v. 3, n. 1, p. 52-70, 2011.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. **Guia Brasileiro de Boas Práticas em Eutanásia em Animais - Conceitos e Procedimentos Recomendados**. Brasília. 2012.

CREPALDI, D. V.; ROTTA, M. A. **Uso do ultra-som em programas de reprodução de peixes nativos**. Embrapa Pantanal. Comunicado técnico, 2007.

CRUZ, R. J. G.; SANTOS, J. E. Testicular structure of three species of neotropical freshwater pimelodids (Pisces, Pimelodidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 21, n. 2, p. 267-271, 2004.

DAGA, V. S.; SKORA, F.; PADIAL, A. A.; ABILHOA, V.; GUBIANI, E. A.; VITULE, J. R. S. Homogenization dynamics of the fish assemblages in Neotropical reservoirs: comparing the roles of introduced species and their vectors. **Hydrobiologia**, v.746, p.327-347, 2015

DAMASCENO, D. Z. **Indução a espermiação do mandi-pintado, *Pimelodus britskii* no período reprodutivo (Teleostei: Pimelodidae)**. 2014. 47f. Dissertação (mestrado em Aquicultura) - Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2014.

DIEMER, O.; NEU, D. H.; BITTENCOURT, F.; SIGNOR, A.; BOSCOLO, W. R.; FEIDEN, A. Eugenol as anesthetic for silver catfish (*Rhamdia voulezi*) with different weight. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 4, p. 1495-1500, 2012.

ELLIS, T.; JAMES, J. D.; STEWART, C.; SCOTT, A. P. A non-invasive stress assay based upon measurement of free cortisol released into the water by rainbow trout. **Journal of Fish Biology**, v. 65, n. 5, p. 1233-1252, 2004.

FEIDEN, A.; SIGNOR, A. A.; DIEMER, O.; SARY, C.; BOSCOLO, W. R.; NEU, D. H. Performance of silver catfish (*Rhamdia voulezi*) juveniles fed with certified organic and commercial ration. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 8, n. 4, p. 381-387, 2010.

FIGUEIREDO, J. R.; CELESTINO, J. J. H.; RODRIGUES, A. P. R.; SILVA, R. V. Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção *in vitro* de embriões em larga escala. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.

31, n. 2, p. 143-152, 2007.

FIGUEIREDO, J. R. Bioética: repensando o uso das biotécnicas reprodutivas. **Ciências Veterinárias nos Trópicos**, v. 11, p. 116-118, 2008.

FROESE, R.; PAULY, D. Editores. FishBase. Publicação eletrônica. Disponível em <www.fishbase.org>, acesso em 24/01/2017, versão (10/2016), 2017

GARAVELLO, J. C.; SHIBATTA, O.A. Reappraisal of *Rhamdia branneri* Haseman, 1911 and *R. voulezi* Haseman, 1911 (Siluriformes: Heptapteridae) from the rio Iguaçu with notes on their morphometry and karyotype. **Neotropical Ichthyology**, v. 14 n. 1, 2016.

GHIRALDELLI, L.; MACHADO, C.; FRACALOSSI, D. M.; ZANIBONI FILHO, E. Desenvolvimento gonadal do jundiá, *Rhamdia quelen* (Teleostei, Siluriformes), em viveiros de terra, na região sul do Brasil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 29, n. 4, p. 349-356, 2008.

GOMES, I. D.; ARAÚJO, F. G. Reproductive biology of two marine catfishes (Siluriformes, Ariidae) in the Sepetiba Bay, Brazil. **Revista de Biologia Tropical**, v. 52, n. 1, p. 143-156, 2004.

GODINHO, H. P. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 3, p. 351-360, 2007.

GOIS, K. S.; PELICICE, F. M.; GOMES, L. C.; AGOSTINHO, A. A. Invasion of an Amazonian cichlid in the Upper Paraná River: facilitation by dams and decline of a phylogenetically related species. **Hydrobiologia**, v. 746, n. 1, p. 401-413, 2015.

GRIER, H. J.; TAYLOR, R. G. Testicular maturation and regression in the common snook. **Journal of Fish Biology**, v. 53, n. 3, p. 521-542, 1998.

GUIMARÃES-CRUZ, R. J.; SANTOS, J. E.; SANTOS, G. B. Gonadal structure and gametogenesis of *Loricaria lentiginosa* Isbrücker (Pisces, Teleostei, Siluriformes). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22, n. 3, p. 556-564, 2005.

HARDMAN, M. The phylogenetic relationships among non-diplomystid catfishes as inferred from mitochondrial cytochrome b sequences; the search for the ictalurid sister taxon (Otophysi: Siluriformes). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 37, n. 3, p. 700-720, 2005.

HONJI, R. M.; CANEPPELE, D.; MOREIRA, R. G. Caracterização macroscópica das gônadas durante a reprodução induzida em cativeiro do surubim do Paraíba. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, v. 8, p. 1110-1114, 2013.

IZQUIERDO, M. S.; FERNANDEZ-PALACIOS, H.; TACON, A. G. J. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. **Aquaculture**, v. 197, n. 1, p. 25-42, 2001.

LOBÓN-CERVIÁ, J.; HESS, L. L.; MELACK, J. M.; ARAUJO-LIMA, C. A. The importance of forest cover for fish richness and abundance on the Amazon floodplain. **Hydrobiologia**, v. 750, p. 245-255, 2015.

LUDWIG, L. A. M.; GOMES, E.; ARTONI, R. F. Um método de reprodução induzida para o surubim *Steindachneridion melanodermatum* (Siluriformes, Pimelodidae) do Rio Iguaçu. **Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 11, n. 3, 2005.

LUNDBERG, J. G.; KOTTELAT, M.; SMITH, G. R.; STIASSNY, M. L.; GILL, A. C. So many fishes, so little time: an overview of recent ichthyological discovery in continental waters. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 87, n. 1, p. 26-62, 2000.

MICROSOFT. **Excel 2016 MSO**. Microsoft Corporation, 2016. Conjunto de programas.

MISE, F. T.; TENCATT, L. F. C.; SOUZA, F. Ecomorphological differences between *Rhamdia* populations (Bleeker, 1858) from the Iguaçu River basin. **Biota Neotropical**, vol. 13, n. 4, 2013.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA – MPA. 2013. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2011**. Disponível em: <www.mpa.gov.br/files/docs/Boletim_MPA_2011_pub.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2015.

MYLONAS, C. C.; FOSTIER, A.; ZANUY, S. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. **General and comparative endocrinology**, v. 165, n. 3, p. 516-534, 2010.

NAKATANI, K.; AGOSTINHO, A.A.; BAUMGARTNER, G.; BIALETZKI, A.; SANCHES, P.V.; MAKRAKIS, M.C.; PAVANELLI, C.S. **Ovos e larvas de peixes de água doce. Desenvolvimento e manual de identificação**. Maringá: EDUEM, 2001.

NELSON, J. S. **Fishes of the World**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2006.

OKAWARA, R. Y.; SANCHES, E. A.; CANEPPELE, D.; DAMASCENO, D. Z.; ROMAGOSA, E. Ovulation and initial rearing of *Steindachneridion parahybae*

(Siluriformes: Pimelodidae) larvae from different accumulated thermal units.

Ichthyological Research, v. 62, p. 495-503, 2015.

LE PAGE, Y.; DIOTEL, N.; VAILLANT, C.; PELLEGRINI, E.; ANGLADE, I.; MÉROT, Y.; KAH, O. Aromatase, brain sexualization and plasticity: the fish paradigm. **European Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 12, p. 2105-2115, 2010.

PESSINI, J. E.; MORO, E. B; FERNANDES, D. R. A.; SIGNOR, A., BOSCOLO, W. R., FEIDEN, A. Vitamina A em dietas para Larvas de Jundiá *Rhamdia voulezi*. **Acta Iguazu**, v. 3, n. 1, p. 28-36, 2014

POMPEU, P. S.; AGOSTINHO, A. A.; PELICICE, F. M. Existing and future challenges: the concept of successful fish passage in South America. **River Research and Applications**, v. 28, p. 504-512, 2012.

PRIMACK, R.B.; RODRIGUES, E. **Biologia da conservação**. Londrina: E. Rodrigues, 2001.

PY-DANIEL, L. H. R.; FERNANDES, C. C. Dimorfismo sexual em Siluriformes e Gymnotiformes (Ostariophysi) da Amazônia. **Acta Amazonica**, v. 35, n. 1, p. 97-110, 2005.

REIS, E. S.; FEIDEN, A.; BOSCOLO, W. R.; FREITAS, J. M. A.; ZAMINHAN, M.; MAHL, I. Processamento da ração no desempenho de juvenis de jundiá (*Rhamdia voulezi*) cultivados em tanques-rede. **Ciência Animal Brasileira**, v. 13, n. 2, p. 205-212, 2012.

ROSA, R. S.; LIMA, F. C. T. Peixes. In: MACHADO, A. B. M.; DRUMMOND, G. M.; PAGLIA, A. P. (Eds.) **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**.

Ministério do Meio Ambiente-MMA, 2008.

SABET, S. S.; IMANPOOR, M. R.; FATIDEH, B. A.; GORGIN, S. Variations in plasma sex steroid hormones of the wild caspian cyprinid fish, kutum (*Rutilus frisii kutum*). **Journal of Cell and Molecular Research**, v. 8, n. 1, p. 25-34, 2016.

SCHRECK, C. B.; CONTRERAS-SANCHEZ, W.; FITZPATRICK, M. S. Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny. **Aquaculture**, v. 197, n. 1, p. 3-24, 2001.

SCHULZ, R. W.; DE FRANÇA, L. R.; LAREYRE, J. J.; LEGAC, F.; CHIARINI-GARCIA, H.; NOBREGA, R. H.; MIURA, T. Spermatogenesis in fish. **General and comparative endocrinology**, v. 165, n. 3, p. 390-411, 2010.

SIGNOR, A.; FEIDEN, A.; BOSCOLO, W. R.; SIGNOR, A. A.; GONÇALVES, G. S.; SARY, C.; KLEIN, S. Reproductive events of the catfish *Rhamdia voulezi* reared in cages. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, n. 3, p. 272-277, 2013.

SIGNOR, A.; GRACIANO, T. S.; PEDRON, F. A.; SILVIDANES, V. P.; FEIDEN, A.; BOSCOLO, W. R.; SIGNOR, A. A. Carcass yield and chemical composition of catfish *Rhamdia voulezi* fed with vitamin B12. **Revista Agrarian**, v. 8, n. 30, p. 414-422, 2015.

SILVA, J. C. R.; SIQUEIRA, D. B.; MARVULO, F. M. V. Ética e bem-estar em animais silvestres unidades de conservação. **Ciências Veterinárias nos Trópicos**, v. 11, n. 1, p. 61-65, 2008

SIMEPAR. **Dados meteorológicos de Toledo/PR, série 2015/2016**. Sistema meteorológico do Paraná, 2016.

STATSOFT, INC. **Programa computacional Statistica 7.0**. E.A.U. 2004.

SULLIVAN, J. P.; LUNDBERG, J. G.; HARDMAN, M. A phylogenetic analysis of the major groups of catfishes (Teleostei: Siluriformes) using *rag1* and *rag2* nuclear gene sequences. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 41, p. 636-662, 2006.

SUZUKI, H. I.; AGOSTINHO, A. A. **Reprodução de peixes do reservatório de Segredo**. In: AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C. (Ed.). **Reservatório de Segredo: bases ecológicas para o manejo**. Maringá: Eduem, 1997.

TARANGER, G. L.; CARRILLO, M.; SCHULZ, R. W.; FONTAINE, P.; ZANUY, S.; FELIP, A.; ANDERSSON, E. Control of puberty in farmed fish. **General and comparative endocrinology**, v. 165, n. 3, p. 483-515, 2010.

TESSARO, L. **Biologia reprodutiva de surubins do Iguaçu, *Steindachneridion melanodermatum*, em condições de cativeiro**. 2015. 77f. Tese (doutorado em Aquicultura) - Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2014.

VAZZOLER, A. E. A. M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. Maringá: EDUEM, 1996.

ZANIBONI FILHO, E.; WEINGARTNER, M. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 3, p. 367-373, 2007.

ANEXOS

ANEXO 1 – PARECER DO COMITE DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

PRO-REITORIA DE PESQUISA E POS-GRADUACAO

COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

RUA UNIVERSITÁRIA, 2069 – PRÉDIO DA BIBLIOTECA – CAMPUS DE CASCAVEL - JD. UNIVERISTÁRIO

FONE: (45) 3220-3272 E 3277 - CEP 85819-110 - CASCAVEL – PR



Comitê de Ética no Uso de Animais CEUA/UNIOESTE

PARECER DE APROVAÇÃO DE PROJETO

PROTOCOLO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL: 03112

TÍTULO DO PROJETO: Tecnologia para formação de bancos de germoplasma e produção de peixes nativos para estocagem no rio Iguaçu

SOLICITANTE: Robie Allan Bombardelli

O projeto acima foi **aprovado**, conforme Ata 06-2012 em reunião ocorrida em 14/08/2012 realizada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais, desde que seguido o protocolo proposto e avaliado por este Comitê.

Lembramos que, de acordo com as atribuições, o CEUA se resguarda do direito de realizar visitas aos locais onde os projetos serão executados com finalidade de acompanhamento.

Ao término da vigência do projeto e apresentação do relatório final, o coordenador receberá um certificado de que o protocolo realizado seguiu os princípios da experimentação animal, de acordo com sua respectiva ata de aprovação em data especificada.

Cascavel, 14 de agosto de 2012.

ProP. Dr.ª Luciana Oliveira de Fariña
Coordenadora CEUA/UNIOESTE
Ata 2861/2012-GRE

ANEXO 2 – PROCEDIMENTO DE COLETA DE SANGUE.

FONTE: O autor (2017)

ANEXO 3 – COLETA DOS ANIMAIS NOS VIVEIROS.

FONTE: O autor (2017)

ANEXO 4 – MATERIAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS NA DETERMINAÇÃO DE ESTEROIDES SEXUAIS PLASMÁTICOS.



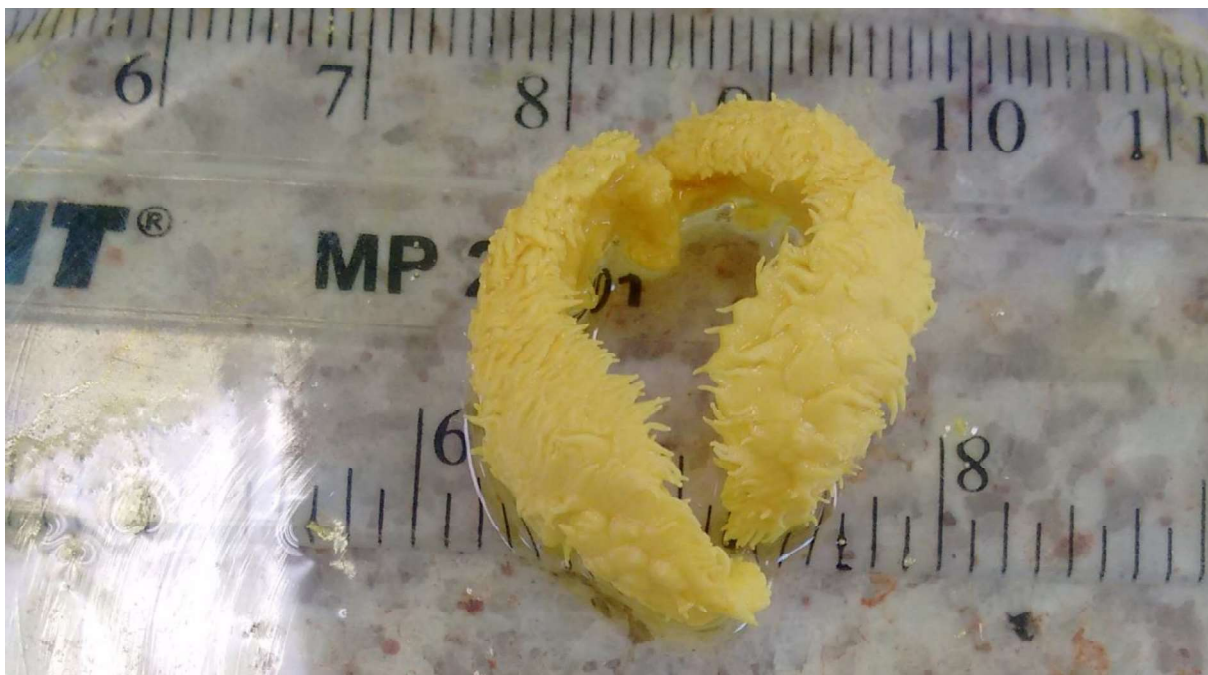
FONTE: O autor (2017)

ANEXO 5 – VISTA GERAL DO INSTITUTO DE PESQUISAS EM AQUICULTURA AMBIENTAL – InPAA.



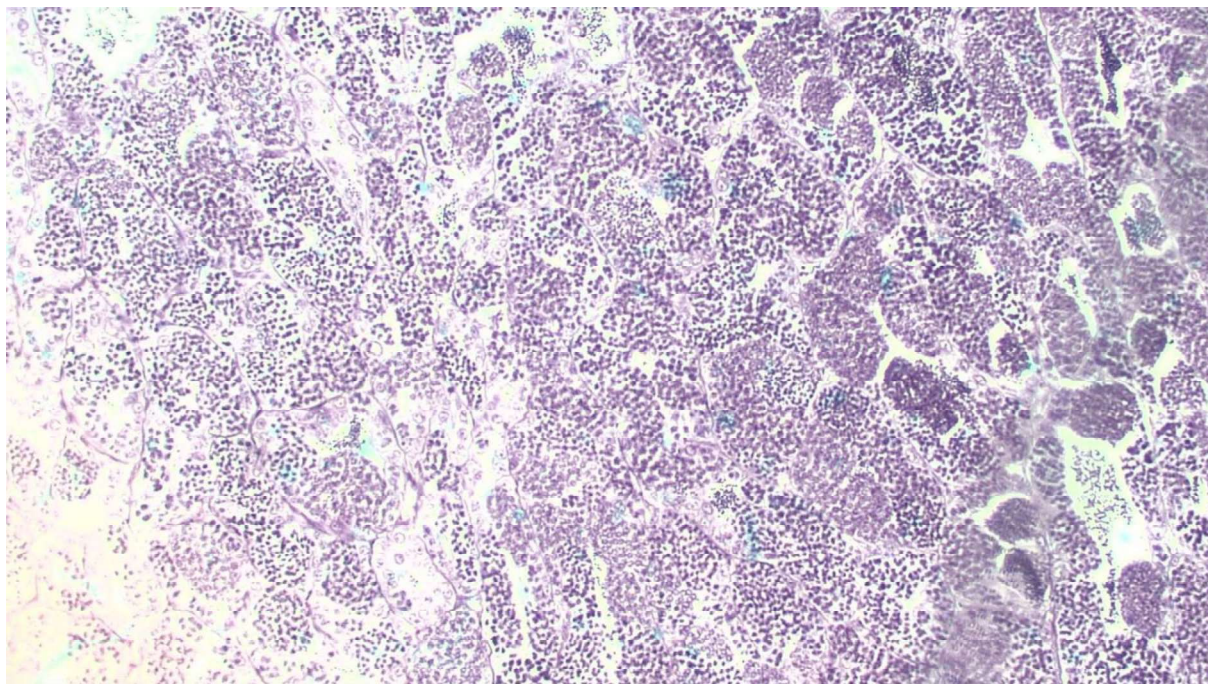
FONTE: Giovano Neumann (2017)

ANEXO 6 – TESÍCULO EM MATURAÇÃO FIXADO EM BOUIN.



FONTE: O autor (2017).

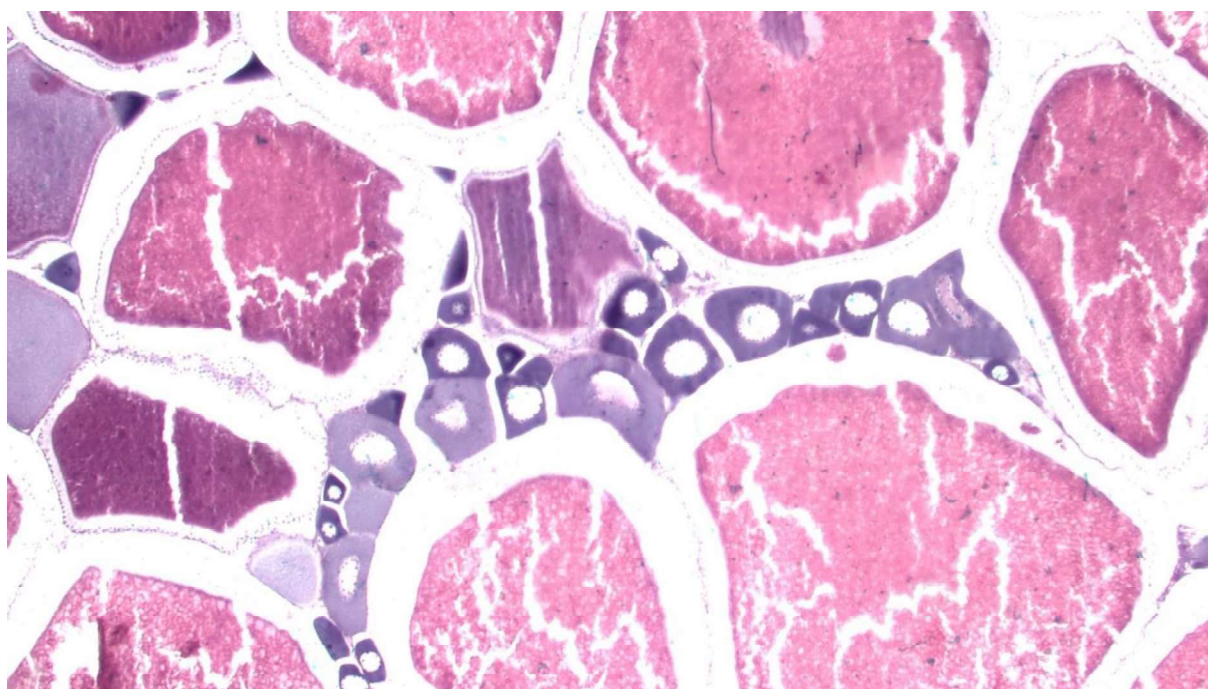
ANEXO 7 – TESÍCULO EM MATURAÇÃO, ASPECTO MICROSCÓPICO.



FONTE: O autor (2017).

ANEXO 8 – OVÁRIO EM MATURAÇÃO FIXADO EM BOUIN.

FONTE: O autor (2017).

ANEXO 9 – OVÁRIO EM MATURAÇÃO ASPECTO MICROSCÓPICO.

FONTE: O autor (2017).